

ANÁLISE DO CANAL CRAC DO HELMINTO *Ascaris lumbricoides*

RAQUEL RIBEIRO BARRETO NUNES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE-UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

Março 2024

ANÁLISE DO CANAL CRAC DO HELMINTO *Ascaris lumbricoides*

RAQUEL RIBEIRO BARRETO NUNES

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Eliza Zeraik

Campos dos Goytacazes-RJ
Março 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE-UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
Março 2024

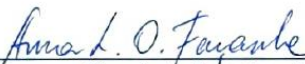
ANÁLISE DO CANAL CRAC DO HELMINTO *Ascaris lumbricoides*

RAQUEL RIBEIRO BARRETO NUNES

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 07 de março de 2024.

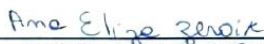
Banca Examinadora:



Prof.ª Dr.ª Anna Lvovna Okorokova Façanha – UENF



Prof. Dr.ª Érica de Oliveira Mello - UENF



Prof. Dr. José Luiz de Souza Lopes - USP



Prof.ª Dr.ª Ana Eliza Zeraik – UENF (orientadora)

Dedico este trabalho à Deus que me fortalece
e à minha família, são eles que
me motivam a avançar...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me abençoar com sua graça e misericórdia para chegar até aqui, sem Ele eu não conseguiria.

Agradeço aos meus pais por sempre me incentivarem a avançar.

Ao meu esposo Jonas e aos meus filhos Karen, Davi e Lucas, pelo amor, apoio, incentivo e ajuda em orações.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Ana Eliza Zeraik pela oportunidade, compreensão, cedência de sua sabedoria, auxiliando-me em todos os momentos na elaboração desse trabalho, reconheço com gratidão.

Às minhas colegas de laboratório, pelo estímulo e encorajamento.

Gratidão à todos do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), local de realização dos experimentos.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem partipar desse momento tão importante.

Sou imensamente grata ao PGBB (Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro por me permitir realizar minha Pós-Graduação.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pois o presente trabalho foi realizado com apoio da mesma.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho.

“Você nunca falhará até parar de tentar”.

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica representativa das áreas endêmicas para geohelmintos no mundo.....	18
Figura 2 - Dois representantes adultos de <i>A. lumbricoides</i>	20
Figura 3 - Ciclo biológico do <i>A. lumbricoides</i>	21
Figura 4 - Distribuição mundial da ascaridíase humana.....	22
Figura 5 - Modelo de ativação do STIM e acoplamento à Orai.....	26
Figura 6 - Visão geral estrutural do canal Orai.....	29
Figura 7 - Mecanismo de interação STIM1-Orai1.....	31
Figura 8 : Predição de domínios de STIM e Orai de <i>A. lumbricoides</i>	40
Figura 9 : Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas STIM (A) e Orai (B) de <i>A. lumbricoides</i>	42
Figura 10 : Análise de restrição de AISTIM e AIOrai em vetores de expressão de mamíferos.....	43
Figura 11 : Células HEK 293 transfectadas com STIM e Orai de <i>H. sapiens</i>	44
Figura 12 : Células HEK 293 transfectadas com as proteínas STIM e Orai de <i>A. lumbricoides</i>	45
Figura 13 : Imagens de microscopia confocal das células HEK293 após 10 minutos de incubação com 1 µM de TG.....	46
FIGURA 14 : Análise SDS-PAGE da Purificação da Proteína AISTIM EF-SAM....	48
FIGURA 15 : Perfil Cromatográfico da proteína AISTIM EF-SAM.....	49
Figura 16 : Espectroscopia de Dicroísmo Circular da região far-UV (CD) STIM EF-SAM <i>A. lumbricoides</i> APO.....	51
Figura 17 : Espectroscopia de Dicroísmo Circular da região far-UV (CD) AISTIM EF-SAM com 5 mM de Ca^{2+}	52
Figura 18 : Influência do cálcio na estrutura secundária de AISTIM EF-SAM.....	52
Figura 19 : Espectroscopia de Dicroísmo Circular da região Far-UV (CD) STIM EF-SAM <i>A. lumbricoides</i>	53
Figura 20 : Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) STIM EF-SAM <i>A. lumbricoides</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS

APO- proteína sem seu ligante ou cofator
BZ- Benzimidazóis
Ca²⁺ - Íons de cálcio
CaCl₂ - Cloreto de cálcio
CD- Dicroísmo Circular
CRAC- Calcium release-activated calcium channel
DMSO- Dimetilsulfóxido
DNA- Ácido Desoxirribonucleico
E. coli- *Escherichia coli*
EGTA- Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
HEK293- Células de Rim Embrionário
IP3- Inositol Trifosfato
IPTG- Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
MUSCLE- Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation
NCBI- National Center for Biotechnology Information
OMS- Organização Mundial de Saúde
PAGE- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PFAM- Base de Dados de Famílias de Proteínas
RE- Retículo Endoplasmático
SAM- Motivo α-Estéril
SOCE- Store-operated Ca²⁺ entry
STIM- Molécula de Interação Estromal
TG- Tapsigargina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.2.1. Nematódeos	17
1.2.2. <i>Ascaris lumbricoides</i>	18
1.2.3 Tratamento e Prevenção da Ascaridíase.....	21
1.3 Canal de Cálcio CRAC	24
1.3.1 Mecanismo Geral do Canal CRAC	24
1.3.2 Proteína Transmembrana Orai	26
1.3.3 Proteína STIM.....	28
1.4 Canal CRAC em Helmintos	31
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.1.1 Objetivos Específicos	33
3. METODOLOGIA	34
3.1 Análise comparativa das sequências proteicas de STIM e Orai de <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Schistosoma mansoni</i> , e <i>Homo sapiens</i>	34
3.2 Clonagem de STIM e Orai de <i>A. lumbricoides</i>	34
3.3 Cultivo de células HEK293	35
3.4 Transfecção de células HEK 293.....	36
3.5 Expressão e purificação de STIM EF- SAM de <i>A. lumbricoides</i>	36
3.6 Espectroscopia de Dicroísmo Circular	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Análises de bioinformática das sequências das proteínas STIM e Orai em <i>S. mansoni</i> , <i>A. lumbricoides</i> e <i>H. sapiens</i>	38
4.2 Clonagem das proteínas STIM e Orai de <i>A. lumbricoides</i>	41
4.3 Transfecção e expressão em células HEK293	42
4.4 Expressão e purificação AISTIM EF-SAM	46
4.5 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) de AISTIM EF-SAM	48
5. CONCLUSÃO	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

As doenças parasitárias são uma das principais causas de morte no mundo, com destaque para as parasitoses intestinais causadas por helmintos. O canal de cálcio CRAC (calcium release-activated calcium channel) ainda é inexplorado na maioria dos parasitas helmintos. Buscamos neste trabalho caracterizar o canal CRAC de *Ascaris lumbricoides*. Uma isoforma de cada uma das proteínas STIM e Orai foi identificada neste parasito e análises bioinformáticas revelaram a conservação de domínios importantes, como o domínio EF-SAM em STIM e regiões transmembranares em Orai. A clonagem dessas proteínas em vetores de expressão permitiu sua expressão em células de mamíferos para estudos funcionais. Orai de *A. lumbricoides* (AIOrai) apresentou localização na membrana plasmática (MP) de células HEK293, conforme observado para as ortólogas humanas. A expressão de STIM de *A. lumbricoides* (AISTIM), entretanto, não se mostrou adequada para a realização de estudos funcionais, com baixos níveis de expressão e alteração na morfologia celular. A coexpressão de STIM humana (HsSTIM) e AIOrai apresentou a localização subcelular esperada (HsSTIM no RE e AIOrai na MP) e mediante estímulo das células com tapsigargina, HsSTIM foi capaz de induzir a formação de puncta em AIOrai, indicando a funcionalidade do canal CRAC de *A. lumbricoides*. O domínio EF-SAM de AISTIM foi expresso e purificado em bactérias de forma a investigar se essa proteína poderia funcionar como um sensor de cálcio. Os espectros de dicroísmo circular revelaram uma estrutura secundária rica em α -hélices. A estabilidade térmica de AISTIM EF-SAM foi monitorada na presença e ausência de Ca^{2+} e pudemos observar um grande aumento de estabilidade na presença do ligante, com um aumento de quase 20 °C no T_m , semelhante ao observado para o ortólogo humano de STIM, indicando que esse domínio pode funcionar como um sensor de cálcio funcional em *Ascaris lumbricoides*. Desta forma, uma caracterização inicial do canal CRAC de *A. lumbricoides* foi realizada através da expressão de suas proteínas em células de mamíferos e em bactérias. Estudos futuros são necessários para que informações sobre o mecanismo de ativação do canal CRAC de *A. lumbricoides* seja melhor compreendido.

Palavras-chave: Canais de cálcio, STIM, Orai, Proteínas ligantes ao cálcio.

ABSTRACT

Parasitic diseases are one of the leading causes of death worldwide, particularly intestinal parasitosis caused by helminths. The calcium release-activated calcium channel (CRAC) remains largely unexplored in most helminth parasites. In this study, we aimed to characterize the CRAC channel from *Ascaris lumbricoides*. One isoform of each, STIM and Orai proteins were identified in this parasite, and bioinformatics analyses revealed the conservation of important domains, such as the EF-SAM domain in STIM and transmembrane regions in Orai. Cloning of these proteins into expression vectors allowed their expression in mammalian cells for functional studies. *Ascaris lumbricoides* Orai (AIOrai) showed localization in the plasma membrane (PM) of HEK293 cells, as observed for human orthologs. However, the expression of *Ascaris lumbricoides* STIM (AISTIM) was not adequate for functional studies, showing low expression levels and alteration in cell morphology. Co-expression of human STIM (HsSTIM) and AIOrai showed the expected subcellular localization (HsSTIM in the ER and AIOrai in the PM), and upon cell stimulation with thapsigargin, HsSTIM induced the formation of puncta in AIOrai, indicating the functionality of the CRAC channel of *A. lumbricoides*. The EF-SAM domain of AISTIM was expressed and purified in bacteria to investigate if this protein could function as a calcium sensor. Circular dichroism spectra revealed a secondary structure rich in α -helices. The thermal stability of AISTIM EF-SAM was monitored in the presence and absence of Ca^{2+} , showing a significant increase in stability in the presence of the ligand, with an increase of almost 20 °C in the T_m , similar to that observed for the human ortholog of STIM, indicating that this domain may function as a functional calcium sensor in *Ascaris lumbricoides*. Thus, an initial characterization of the CRAC channel of *A. lumbricoides* was performed by expressing its proteins in mammalian cells and bacteria. Further studies are needed to better understand the mechanism of activation of the CRAC channel from *A. lumbricoides*.

Keywords: Calcium channels, STIM, Orai, Calcium-binding proteins.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enteroparasitoses

As infecções por parasitos intestinais da classe dos helmintos, conhecidas como enteroparasitoses, apresentam-se no intestino e podem levar a diversas patologias, como anemia e desnutrição, clinicamente, essas doenças causam perda de apetite, má absorção intestinal, danos à mucosa intestinal. A anemia representa uma das consequências mais graves da doença relacionada aos parasitos intestinais pois, pode afetar gravemente os indivíduos, levando-os à óbito. (Pereira *et. al.*, 2020). Essas enfermidades são frequentemente causadas por altas cargas parasitárias nos indivíduos, bem como por reinfecções recorrentes (Lagatie *et. al*, 2020).

As enteroparasitoses são consideradas um sério problema socioeconômico, afetando principalmente regiões em desenvolvimento. Isso está associado à falta de saneamento básico e higiene pessoal adequada, fatores que contribuem para a disseminação dos parasitas entre a população e permitem a manutenção do ciclo biológico desses organismos (Siqueira, 2019).

De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde), 24% da população mundial está infectada com parasitos helmintos transmitidos pelo solo. As enteroparasitoses causadas por helmintos representam um problema de saúde pública mundial sendo responsáveis por altos índices de mortalidade, principalmente em países em desenvolvimento, onde uma parte da população carece de saneamento básico. Além disso, a reinfecção é frequente em pessoas que residem ou retornam a áreas endêmicas. Embora medicamentos seguros e eficazes estejam disponíveis gratuitamente em países endêmicos, apenas metade das crianças em risco recebe tratamento. Um terço da população das cidades desses países vive em condições ambientais favoráveis à propagação de infecções parasitárias (Andrade *et al.* 2017), sendo indicadores de pobreza e desigualdades na área da saúde (Cardona-Arias, 2018).

As infecções parasitárias podem ser transmitidas através do consumo de água e/ou alimentos contaminados com matéria fecal, penetração intradérmica, de indivíduo para indivíduo ou de animais para o homem (OMS, 2019). A contaminação de espaços públicos é um importante fator que contribui para a morbidade relacionada às enteroparasitoses, especialmente aquelas de perfil zoonótico, devido

à presença frequente de animais nesses ambientes. Vários patógenos, como helmintos e protozoários, podem parasitar animais, que, ao defecarem no solo, podem contaminar o ambiente e eventualmente levar à infecção humana (Jacinto, 2020).

As parasitoses intestinais podem afetar pessoas de todas as idades, a prevalência dessas infecções é especialmente comum em crianças na pré-escola e no ensino fundamental. Nesses estágios, as crianças geralmente não praticam uma higiene adequada das mãos, o que favorece a constante transmissão (Bethony *et al.*, 2006). Diversas pesquisas indicam que essas infecções durante a infância podem comprometer o desenvolvimento físico e intelectual das crianças (Da Silva *et al.*, 2021). Durante o período de contaminação ou evolução da doença, é comum que essas crianças precisem ficar em casa por um longo tempo até se recuperarem. Essa ausência prolongada pode impactar negativamente o seu desenvolvimento educacional e social (Ministério da Saúde, 2018).

As infecções causadas por helmintos resultam em centenas de mortes evitáveis a cada ano e são consideradas um dos problemas de saúde pública mais recorrentes em todo o mundo. Embora não sejam oficialmente designadas como doenças de notificação compulsória, afetam cerca de 3,5 bilhões de pessoas globalmente. Dentre as espécies que mais acometem os indivíduos, destacam-se *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma spp* e *Trichuris trichiura*, os quais infectam aproximadamente 1.450 milhão, 1.300 milhão e 1.050 mil de pessoas no planeta, respectivamente (Almeida, 2019).

Além dos efeitos patológicos diretos da parasitose, a falta de um ou mais nutrientes ou a má assimilação dos alimentos aumenta a probabilidade de morte, reduz o desenvolvimento cognitivo e pode causar danos irreversíveis à saúde, devido aos seus efeitos prejudiciais no desenvolvimento biofísico do hospedeiro (Soares *et al.*, 2020).

A OMS tem enfatizado que o controle das parasitoses intestinais deve ser alcançado através da implementação de estratégias quimioterapêuticas adequadas para a população-alvo, bem como do estabelecimento de um monitoramento de rotina e controle efetivo da dinâmica da infecção (OMS, 2017).

1.2 Helmintos Transmitidos Pelo Solo

Existem dois grandes grupos de helmintos, que são classificados em filos distintos: Nematelmintos e Platelminhos. O primeiro grupo consiste em vermes que possuem um corpo cilíndrico, enquanto o segundo grupo é composto por vermes de corpo achatado dorso-ventralmente, apresentando vida livre ou parasitária. Três classes de parasitas se destacam entre os helmintos: Nematoda, Cestoda e Trematoda (Amarante *et al.*, 2014).

Apesar de cada espécie de helminto apresentar características específicas, as helmintíases são agrupadas conjuntamente para fins de controle devido a similaridades na endemicidade geográfica, grupos de risco afetados, tratamento com os mesmos medicamentos, utilização das mesmas ferramentas de diagnóstico e mecanismo semelhante de impacto negativo na saúde humana, associado à intensidade da infecção (OMS, 2017).

As geo-helmintíases são doenças parasitárias amplamente distribuídas em todas as regiões do mundo, especialmente em áreas onde as populações vivem em condições precárias de serviços básicos de saúde e saneamento. No Brasil, os geo-helmintos são encontrados em todo o país, com maior incidência nas zonas rurais e periferias dos centros urbanos, onde o saneamento básico é precário e o conhecimento sobre transmissão e prevenção é limitado (Brasil, 2010).

A transmissão de helmintos ocorre principalmente através da contaminação do solo, sendo essa a forma mais comum de infecção. Eles podem apresentar três formas morfológicas básicas: ovos, larvas e vermes adultos. Os ovos são produzidos a partir da fertilização de gametas femininos e variam em tamanho e formato e possuem uma notável capacidade de sobrevivência, permanecendo viáveis por meses e até anos (Providelo, 2019). Essa resistência dos ovos é atribuída a uma característica peculiar: geralmente são recobertos por uma casca externa albuminosa espessa, uma camada intermediária também espessa e uma membrana vitelina interna pouco permeável, o que torna esses ovos extremamente resistentes no ambiente externo. É importante observar que em alguns ovos férteis, conhecidos como decorticados, a camada albuminosa pode estar ausente, o que pode afetar sua viabilidade e resistência (Melo *et al.*, 2015).

As larvas, em ambientes adequados, se desenvolvem no interior dos ovos, emergem (eclodem dos ovos) e continuam a amadurecer. Essas larvas são delgadas e longas. À medida que crescem, completam o processo de maturação, resultando na formação dos vermes adultos. As fêmeas adultas geralmente são maiores do que os machos. Ambos os sexos possuem sistemas digestivo e reprodutivo completos. As características específicas variam de acordo com cada espécie de helminto (Zeibing, 2014).

Para que ocorra a infecção parasitária, é essencial que as condições sejam favoráveis ao parasito (Cardoso, 2017). Diversos fatores podem influenciar positivamente o desenvolvimento de infecções parasitárias, como o estado do sistema imunológico do hospedeiro, as condições precárias de saneamento e habitação, a alta taxa de migração, a destruição do ecossistema e mudanças nos hábitos de vida (Simões *et al.*, 2015).

Além disso, é importante destacar que algumas espécies de parasitos estão restritas a determinadas regiões, sendo necessário que a tríade composta pelo "parasito, hospedeiro e meio ambiente" esteja favorável para que ocorra a infecção parasitária (Simões, 2015). Ou seja, é preciso que as condições sejam propícias tanto para a presença do parasito quanto para a vulnerabilidade do hospedeiro, bem como para o ambiente em que a interação ocorre, a fim de que a infecção seja estabelecida. O solo é essencial no ciclo de vida dos geo-helmintos, pois os ovos requerem incubação em um ambiente quente e úmido para se tornarem infectantes. (Frei, 2008).

As infecções por geo-helmintos são atribuídas principalmente aos seus efeitos crônicos e insidiosos na saúde e qualidade de vida, uma vez que a morbidade é significativamente elevada em casos de infecções intensas (Johnston *et al.*, 2015).

Nos países em desenvolvimento, a qualidade da saúde da população, sua prevenção e manutenção são desafios significativos. A implementação de medidas como saneamento básico, acesso adequado à água e práticas de higiene regulares têm se mostrado altamente eficazes na prevenção de doenças parasitárias e na promoção da saúde. No entanto, com o contínuo aumento da população mundial, que ultrapassa 7,9 bilhões de habitantes, esses problemas tendem a se agravar (Wolf *et al.*, 2018).

Essa distribuição populacional (figura 1), em diferentes continentes cria desafios únicos para a saúde pública e requer abordagens adaptadas às realidades

regionais. O gerenciamento da saúde nessas regiões em desenvolvimento exige a implementação de estratégias inovadoras e sustentáveis, bem como a cooperação internacional para enfrentar os problemas em escala global. O foco contínuo na prevenção de doenças, educação em saúde e investimentos em infraestrutura sanitária são cruciais para melhorar a saúde e o bem-estar das populações nessas regiões (OMS, 2017).

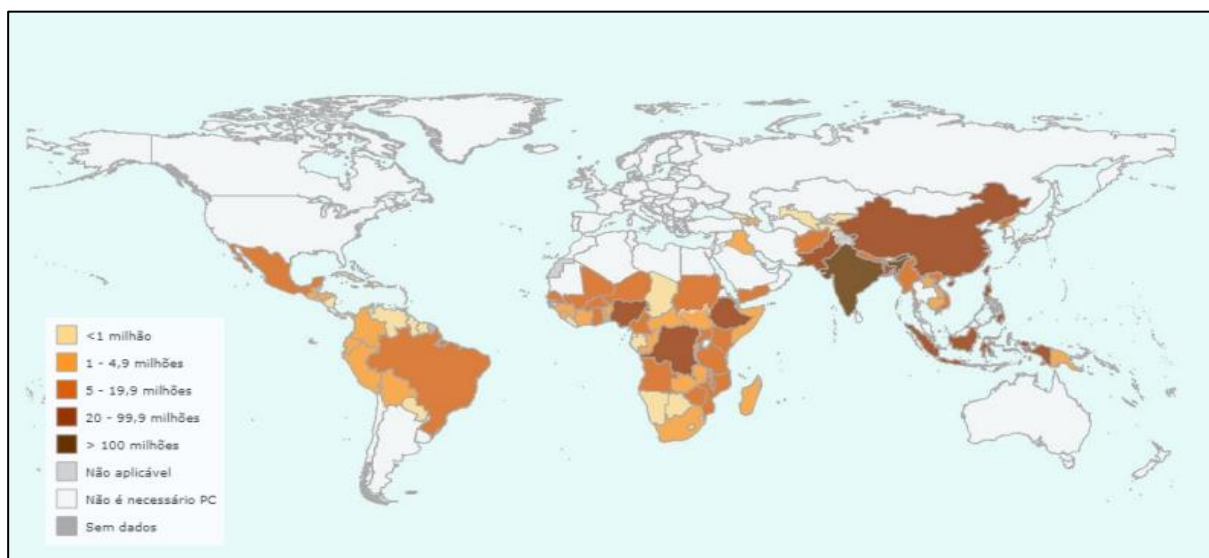


Figura 1 - Distribuição geográfica representativa das áreas endêmicas para geohelmintos no mundo. A legenda indica o número de pessoas, em milhões, que residem em regiões endêmicas para os geo-helmintos.

Fonte: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sth/sth.html

1.2.1. Nematódeos

O filo Nematoda é um dos táxons mais diversos do reino animal, eles estão entre os metazoários mais amplamente distribuídos e abundantes na Terra (Ruppert *et al.*, 2005). Esse filo engloba 3 classes, 31 ordens, 267 famílias, 2.829 gêneros e 24.783 espécies (Zhang *et al.*, 2011), o que o torna diversificado e variado em termos de suas características e adaptações evolutivas (Neto, 2017).

Os nematódeos representam uma grande diversidade biológica que desempenha um papel significativo nos ecossistemas terrestres e aquáticos, mostrando-se como um grupo de animais amplamente distribuído e bem-sucedido em diversas condições ambientais (Blaxter *et al.*, 2015). Possuem um corpo cilíndrico e alongado, não segmentado, com simetria bilateral e extremidades

afiladas. O tamanho do corpo varia de 1 mm a mais de 1 m de comprimento (Geraert *et al.*, 2019).

Esses organismos possuem a superfície do corpo coberta por uma cutícula, uma camada externa secretada pela hipoderme subjacente. Durante o crescimento e maturação, essa cutícula sofre mudas periódicas, de forma semelhante ao que ocorre em artrópodes, sendo trocada pelo menos quatro vezes ao longo da vida dos nematódeos (Vicente *et al.*, 1985). Essa cutícula desempenha um papel essencial na proteção e suporte estrutural do corpo do nematoide (Zhang *et al.*, 2011).

Os nematódeos possuem um sistema digestivo completo, compreendendo a boca, cavidade bucal, esôfago, intestino e ânus. Quanto à coloração, os indivíduos podem ser observados a olho nu e apresentam uma tonalidade branco-avermelhada ou são translúcidos (Moravec *et al.*, 1998).

O dimorfismo sexual que eles apresentam é caracterizado pela diferença na cauda entre fêmeas e machos. As fêmeas possuem uma cauda simples, enquanto os machos têm a cauda recurvada ou espiralada, também são tipicamente menores em tamanho. Essas características específicas são essenciais para a identificação e classificação de nematoides, o que permite a compreensão da diversidade e as características únicas dessa importante classe de organismos (Geraert *et al.*, 2019).

1.2.2. *Ascaris lumbricoides*

O nematóide *Ascaris lumbricoides* (Figura 2) vive no intestino delgado de seus hospedeiros é um dos vermes mais prevalentes em seres humanos, sendo classificado como cosmopolita, pode ser encontrado praticamente em qualquer lugar do mundo, de preferência em solos argilosos úmidos e arenosos (Jourdan *et al.*, 2018).

A transmissão de *A. lumbricoides* ocorre principalmente pela ingestão de água ou alimentos contaminados com ovos férteis do parasito. Muitas vezes, a água utilizada para irrigação de hortas, lavagem de frutas e verduras está contaminada, resultando na contaminação desses alimentos com ovos viáveis do parasito. Além disso, a poeira, aves e insetos podem atuar como veículos mecânicos, transportando os ovos de *A. lumbricoides* (Braga *et al.*, 2007).



Figura 2 - Dois representantes adultos de *A. lumbricoides*.

Fonte: Santos, 2022.

A ascaridíase em humanos, doença parasitária causada por *A. lumbricoides* é comum em países que carecem de saneamento básico adequado e higiene pessoal. Pessoas afetadas podem apresentar determinados sintomas, dependendo do órgão atingido e severidade da infecção, como dor abdominal, diarreia e náusea, bloqueio mecânico do intestino delgado, principalmente em crianças, ou seja, o funcionamento natural do intestino é alterado (Melo *et al.*, 2004). Em infecções maciças, podem aparecer casos de deficiência nutricional e cognitiva, nas vias respiratórias, pode apresentar broncoespasmo, hemoptise e pneumonite, caracterizando a síndrome de Löeffler, que cursa com eosinofilia importante (Teixeira *et al.*, 2019).

A infecção por *A. lumbricoides* começa com a ingestão dos ovos presentes no ambiente, passa pelo desenvolvimento das larvas até se tornarem vermes adultos no intestino delgado e, finalmente, os ovos produzidos pelos vermes adultos são eliminados nas fezes do hospedeiro. O diagnóstico para ascaridíase é realizado pela microscopia óptica (Leles *et al.* 2012). É importante manter práticas adequadas de higiene, tratamento de água e manipulação de alimentos para prevenir a transmissão desses parasitos (Evangelista, 2020).

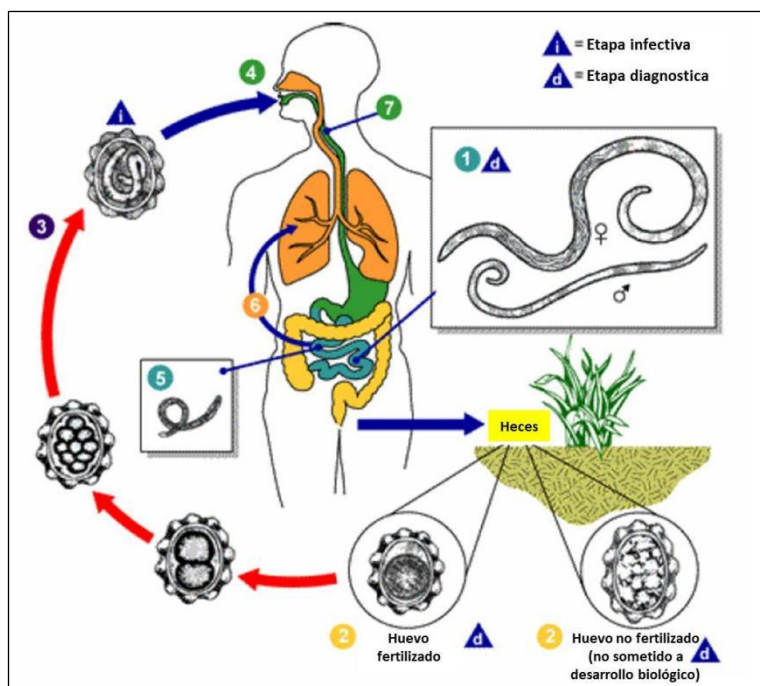


Figura 3 - Ciclo biológico do *A. lumbricoides*.

Fonte: Alves, 2014.

O parasito *A. lumbricoides* é considerado um representante importante para pesquisas bioquímicas e genômicas devido ao seu grande tamanho na fase adulta, em média de 30 cm para fêmeas e 15 cm para machos, também devido à sua grande produção de ovos. Isso permite o fácil isolamento de grande quantidade de material em diferentes estágios de desenvolvimento, incluindo vários tecidos germinativos e somáticos. São sexualmente dimórficos, com tratos reprodutivos masculinos e femininos com cerca de 1 a 2 m de comprimento quando totalmente estendidos (Wang *et al.*, 2020).

As infecções parasitárias intestinais por *A. lumbricoides* estão distribuídas potencialmente em todo o mundo, tendo altas taxas de prevalência em partes tropicais e subtropicais, infectando em torno de 5% das crianças em idade escolar, estima-se que no mundo 320 milhões de pessoas estão contaminadas por *A. lumbricoides* (Maia *et al.*, 2015). A ascaridíase continua sendo uma doença negligenciada, apesar de sua distribuição global e do alto número de indivíduos infectados. Os últimos relatórios globais demonstram um aumento na distribuição de medicamentos para controle de geo-helmintos, como *A. lumbricoides*, tal fato acentua o risco de resistência anti-helmíntica (Krücken *et al.*, 2017).

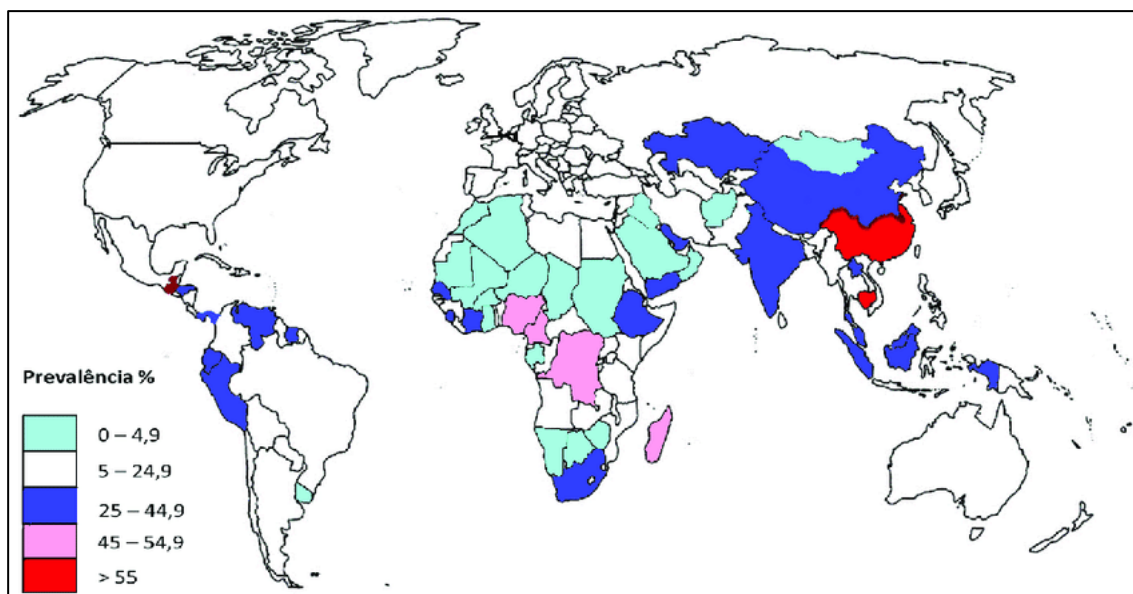


Figura 4 - Distribuição mundial da ascaridíase humana.
Fonte: Cavallero *et al.* 2013.

1.2.3 Tratamento e Prevenção da Ascaridíase

A média de cura com terapia anti-helmíntica é superior a 95 %. A maioria dos pacientes tratados em áreas endêmicas torna-se reinfectedada em poucos meses (de Andrade Júnior *et al.*, 2020). A terapia anti-helmíntica remove os vermes adultos do trato gastrointestinal, reduzindo a morbidade (doença) e a transmissão de infecções. (Conterno *et al.*, 2020).

Os medicamentos anti-helmínticos recomendados para o controle e eliminação da infecção incluem os medicamentos benzimidazóis, ou seja, albendazol e o mebendazol, que agem interferindo no sistema microtubular do parasito (Utzinger, 2004). Esses medicamentos são amplamente reconhecidos como os principais tratamentos para lombrigas e possuem várias vantagens, como serem de baixo custo, seguros e de fácil administração. Uma das principais vantagens é que não é necessário pesar as crianças, pois a dosagem é a mesma tanto para elas quanto para os adultos (Lubis *et al.*, 2012).

O Albendazol é um medicamento do grupo dos benzimidazóis com amplo espectro antiparasitário, especialmente eficaz contra o *A. lumbricoides* (Sawaros, 1999). A dose única de 400 mg demonstra alta eficácia no tratamento da ascaridíase, com níveis de cura e redução de ovos de até 100%. Uma vantagem adicional é seu efeito ovicida, que atua de duas maneiras (Paul *et al.*, 1999).

Primeiramente, ele se liga seletivamente às tubulinas, inibindo a tubulina-polimerase e prevenindo a formação de microtúbulos, o que impede a divisão celular do parasita. Além disso, o Albendazol impede a captação de glicose, inibindo a formação de ATP, que é uma fonte de energia essencial para o verme (Williams *et al.*, 2003). Importante destacar que o Albendazol tem baixa absorção pelo hospedeiro, agindo diretamente no trato gastrointestinal. A fração absorvida é metabolizada no fígado e possui uma meia-vida de aproximadamente 9 horas. Posteriormente, é excretado com a bile pelos rins (Belizario *et al.*, 2003).

Após a administração de uma única dose, é relatado que entre 92% e 100% dos casos apresentam níveis de cura e redução da taxa de ovos. O Albendazol é uma opção altamente eficaz e segura para o tratamento da ascaridíase (da Silva Costa *et al.*, 2021).

O Mebendazol é outro derivado dos benzimidazóis, apresentando uma efetiva atividade anti-helmíntica. Uma dose única oral de 500 mg é altamente eficaz contra a ascaridíase. Em casos refratários, o número de ovos de *Ascaris* nas fezes é significativamente reduzido, resultando em poucos ovos no ambiente (Evans *et al.*, 1987). Por isso, o Mebendazol é amplamente utilizado tanto em tratamentos em massa quanto em tratamentos individuais nos programas de controle.

O mecanismo de ação do Mebendazol é semelhante ao descrito para o Albendazol. A absorção do fármaco é limitada, mas pode ser aumentada com a ingestão de alimentos gordurosos. A metabolização do Mebendazol ocorre principalmente no fígado, e sua excreção pode ocorrer através da bile e da urina. Os metabólitos não possuem atividade antiparasitária. A maior parte dessas substâncias é excretada nas fezes inalterada, o que explica uma boa atividade contra os helmintos intestinais (Albonico, 2003).

Em países endêmicos, esses medicamentos são doados aos ministérios da saúde nacionais pela OMS para o tratamento de crianças em idade escolar (OMS 2017).

Teoricamente há resistência emergente de helmintos ao Albendazol e Mebendazol isso pode ser uma das razões para as taxas de cura relativamente baixas encontradas em diversos estudos. Ao longo de todo o mundo existem relatos de resistência de nematóides a derivados de benzimidazóis (BZ), em humanos (Mc Mahon *et al.*, 2013).

Muitos dos programas globais para a eliminação da ascaridíase dependem do uso de anti-helmínticos do grupo dos benzimidazóis (BZ) e isso pode aumentar a pressão para o desenvolvimento de resistência a esses anti-helmínticos em nematóides parasitas de seres humanos (Lamberton *et al.*, 2015).

É fundamental realizar o monitoramento da resistência anti-helmíntica nesses programas de controle de parasitas nematóides em seres humanos. Para isso, é necessário desenvolver novas ferramentas que tornem esse monitoramento mais sensível, econômico e prático. Uma abordagem promissora é o uso de marcadores baseados em DNA para detectar a resistência aos benzimidazóis (BZ) em parasitas nematoides de seres humanos (Legesse *et al.*, 2004).

Há grupos de estudos que buscam entender os mecanismos moleculares e a genética da resistência a BZ em alguns parasitas nematóides humanos. Com base na probabilidade de que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) semelhantes estejam envolvidos na resistência a BZ em humanos, é possível desenvolver técnicas de detecção baseadas em DNA para avaliar a resistência em populações de parasitas nematóides humanos, auxiliando na identificação e manejo eficaz dessa resistência (Prichard, 2007).

Diversas medidas de prevenção podem ser implementadas, até mesmo políticas públicas, objetivando diminuir a prevalência, a intensidade e a gravidade, reduzindo os níveis a números significantes. O processo é relativamente lento, gera altos investimentos e acaba não sendo utilizado com o tempo (Gross e Silva, 2016).

Desta maneira, a busca por novos alvos moleculares para combater a ascaridíase e outras parasitoses se torna essencial. O íon Ca^{2+} é um elemento essencial para inúmeros processos celulares, agindo em processos de sinalização que controlam a expressão gênica, divisão celular e crescimento, contração muscular, transmissão neuronal, entre outros (Clapham, 2007; Nawaratna *et al.*, 2018). Devido a sua ligação com diferentes proteínas, Ca^{2+} é capaz de induzir mudanças conformacionais que permitem a ativação ou inibição de enzimas, canais iônicos, transportadores, ou tampões Ca^{2+} . Desta maneira, canais de cálcio representam alvos terapêuticos atrativos contra organismos patogênicos, muitos agentes antiparasitários alteram a homeostase de cálcio (Prole *et al.*, 2011).

1.3 Canal de Cálcio CRAC

O canal CRAC foi inicialmente caracterizado eletrofisiologicamente em células T e mastócitos por Lewis e Cahalan em 1989. As características fundamentais do canal CRAC incluem a ativação em resposta à redução da concentração de Ca^{2+} no retículo endoplasmático (ER) e uma notável seletividade para o íon Ca^{2+} em condições fisiológicas (Lewis e Cahalan, 1989).

Esse canal apresenta uma pequena corrente unitária, aproximadamente estimada em 6 fA em solução fisiológica normal a -110 mV (Prakriya e Lewis, 2006), o que sugere a existência de uma barreira energética para a passagem de íons através do poro. Essa barreira pode ser atribuída, em parte, a uma restrição física resultante do diâmetro estreito dos poros, que é inferido ser de cerca de 0,39 nm, com base na permeação de cátions orgânicos na ausência de Ca^{2+} (Bakowski e Parekh, 2002).

Até recentemente, os inibidores seletivos do canal CRAC não estavam disponíveis (Prakriya e Lewis, 2015). No entanto, o perfil clássico do canal CRAC inclui o bloqueio em resposta a baixas concentrações de lantanídeos (Hoth e Penner, 1993; Ross e Cahalan, 1995; Aussel *et al.*, 1996) e aumento da corrente em resposta a baixas concentrações e bloqueio em resposta a altas concentrações de borato de 2-aminoetoxidifenil (2-APB) (Prakriya e Lewis, 2001).

A corrente CRAC foi inicialmente observada eletrofisiologicamente em células T e mastócitos, mas estudos posteriores têm demonstrado sua presença em outras células (Parekh e Putney, 2005). Essas observações dispersas antecipam a ampla distribuição tecidual das proteínas Orai e o seu papel fisiológico crucial em diversos tecidos, desde a pele até o epitélio secretor e o músculo (Davis *et al.*, 2015; Concepcion *et al.*, 2016).

1.3.1 Mecanismo Geral do Canal CRAC

A via de cálcio SOCE (Store operated calcium entry) é mediada pelo canal CRAC, a entrada de Ca^{2+} por esta via é um mecanismo crucial que controla uma variedade diversificada de vias de sinalização e é essencial para praticamente todos os eucariotos (Prakriya e Lewis, 2015; Amcheslavsky *et al.*, 2015).

A ativação de Orai (proteína formadora do canal de Ca^{2+} da membrana plasmática) é mediada pela molécula de interação estromal (STIM), uma proteína

de membrana integral do RE com um motivo EF-hand no lado luminal (Ross J. *et al.*, 2005). A diminuição nos níveis de Ca^{2+} do RE causa a dissociação de Ca^{2+} do motivo Ef-hand, a oligomerização das proteínas STIM e a translocação para as junções do RE com a membrana plasmática, onde se ligam e ativam os canais Orai (Hogan *et al.*, 2015).

Os complexos Orai/STIM podem ser observados ao microscópio como pontos distintos (*puncta*). Mutações em Orai e STIM *podem* causar distúrbios imunológicos, fraqueza muscular e displasias ectodérmicas, ressaltando suas importantes funções fisiológicas (Lacruz *et al.*, 2015).

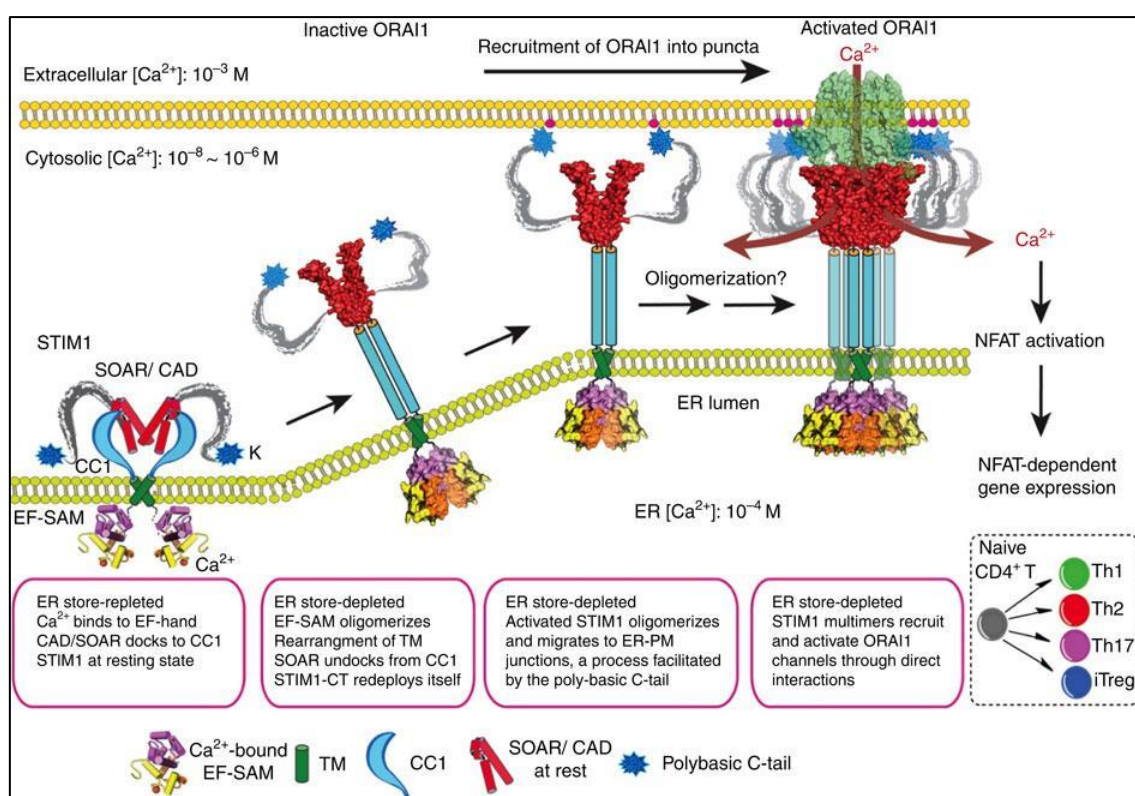


Figura 5 - Modelo de ativação do STIM e acoplamento à Orai. Este modelo enfatiza as interações de domínio mediando o acoplamento entre STIM e Orai. À esquerda, em condições de estado de repouso em que os depósitos de Ca^{2+} estão completos, STIM permanece em uma conformação compacta. O bloqueio intramolecular envolve pontes de hidrogênio entre uma hélice inibitória (azul) na extremidade C-terminal da primeira espiral com a região CAD/SOAR. A depleção de cálcio promove uma mudança conformacional em STIM, para uma conformação mais estendida, que interage com Orai na membrana plasmática e ativa o canal.

Fonte Imagem: Ma *et al.*, 2015.

1.3.2 Proteína Transmembrana Orai

A proteína Orai é um importante componente dos canais de cálcio ativados por depleção do íon (CRACs), atuando como sua subunidade principal (Prakriya, 2015). Orai é uma proteína transmembranar de quatro hélices presente na membrana plasmática, que forma um poro iônico responsável pela entrada de Ca^{2+} nas células após ativação (Feske *et al.*, 2015). Diversas mutações na proteína Orai1 foram mapeadas e interferiram em sua capacidade de formar poros funcionais, destacando seu papel estrutural nesses canais (Vogel *et al.*, 2016).

A arquitetura dos poros do canal Orai, demonstram que a estrutura de Orai hexamérica (Figura 6), essa informação foi revisada por Amcheslavsky *et al.* (2015), já que estudos com concatêmeros de Orai1 e experimentos de fluorescência de molécula única sugeriram anteriormente que o canal era um tetrâmero. No entanto, a conclusão de que Orai é um hexâmero foi reforçada pela determinação da massa molecular do complexo do canal purificado, por cristalografia de raios X, crosslinking e espalhamento de luz (Hou *et al.*, 2012).

A ativação da proteína Orai ocorre por intermédio da interação física com a proteína STIM após a detecção de redução dos níveis de Ca^{2+} no retículo endoplasmático (Soboloff *et al.*, 2012). Tal associação promove a redistribuição e agrupamento de Orai na membrana plasmática, permitindo a formação do poro de CRAC e subsequente influxo iônico (Park *et al.*, 2010). Processos celulares fundamentais como contração, secreção e transdução de sinal dependem do correto funcionamento dos CRACs mediado pela proteína Orai (Prakriya, 2006). Seu papel nos canais ativado por depleção de cálcio destaca a importância da Orai para funções de diversas células, como neurônios e linfócitos (Feske, 2015).

O *gating* do canal depende de uma interação direta entre os canais Orai1 e STIM (Gudlur *et al.* 2013). Essa interação inicial em células, que recruta Orai para as junções, requer as regiões citoplasmáticas C-terminais de Orai (Li *et al.* 2007). Acredita-se que região N-terminal de Orai é de extrema importância para a ativação do canal dependente de STIM (Li *et al.*, 2007; McNally *et al.*, 2013; Derler *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2013; Palty e Isacoff, 2016). As características exatas da interação entre STIM e Orai ainda não estão completamente esclarecidas e continuam sendo o foco principal de muitos laboratórios de pesquisa (Prakriya e Lewis, 2015; Amcheslavsky *et al.*, 2015; Shim *et al.*, 2015; Derler *et al.*, 2016).

Diversos estudos contribuíram para o entendimento da estequiometria da interação entre STIM1 e Orai por meio de abordagens combinadas, como por exemplo as análises de Yen, 2019 e colaboradores. Análises bioquímicas revelaram que cada molécula de STIM1 liga-se a três moléculas de Orai após depleção do Ca^{2+} do RE (Luik *et al.*, 2008). Experimentos com proteínas de fusão fluorescentes STIM1 e Orai marcadas com diferentes cores mostraram que estas formam agregados contendo aproximadamente três unidades de Orai por domínio de ativação do cálcio de STIM1 (Zheng *et al.*, 2011). Estudos eletrofisiológicos utilizando canais Orai mutantes demonstraram que os poros de CRAC formam oligômeros contendo entre dois e quatro subunidades Orai (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2023).

Pesquisas combinando cristalografia de raios X e mutagênese direcionada esclareceram que o domínio de ativação do cálcio de STIM1 pode ligar-se a três monômeros de Orai simultaneamente (Stathopoulos *et al.*, 2017). Diversas abordagens contribuíram para o atual modelo de que STIM1 recruta e ativa canais CRAC formados por oligômeros contendo três moléculas de Orai (Luik *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2011; Vázquez *et al.*, 2013; Stathopoulos *et al.*, 2013).

O papel do Orai na regulação da entrada de Ca^{2+} foi inicialmente identificado através de experimentos de RNAi em células *Drosophila* S2 (Feske *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006a; Zhang *et al.*, 2006). A descoberta foi associada ao mapeamento genético da imunodeficiência combinada grave (SCID) em humanos, identificando o gene Orai1 na região do cromossomo humano 12. Portadores de SCID eram heterozigotos para uma mutação R91W em Orai1, enquanto pacientes SCID eram homozigotos. A reconstituição de células T de um paciente SCID com Orai1 do tipo selvagem restaurou a corrente CRAC. (Hogan *et al.*, 2010; Feske *et al.*, 2006).

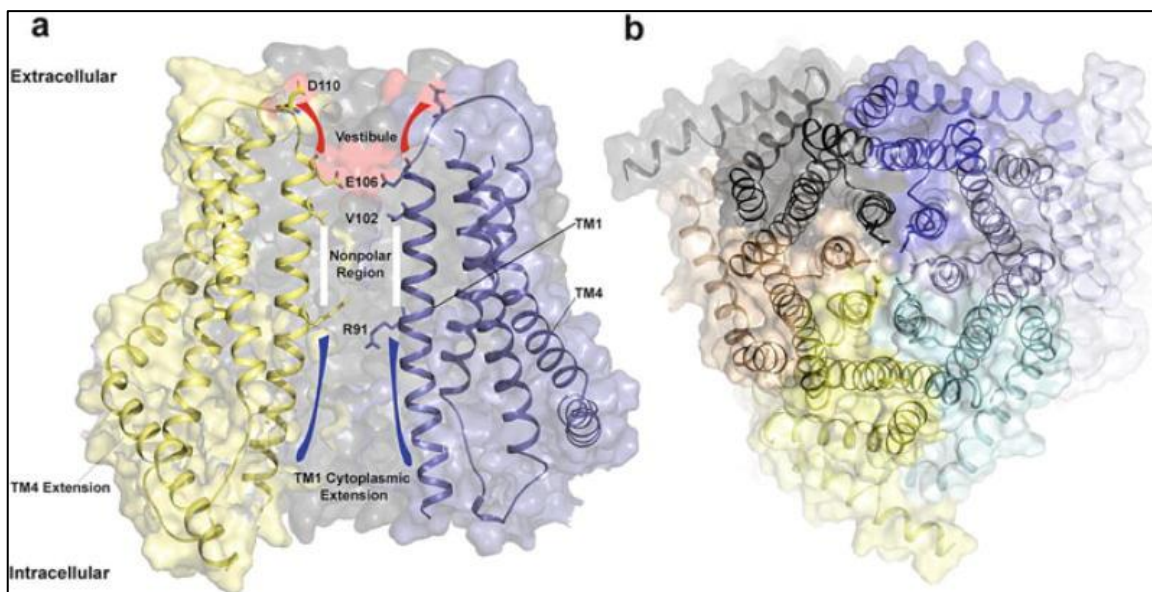


Figura 6 - Visão geral estrutural do canal Orai: (a) Uma visão em corte do modelo Orai1 humano, gerado utilizando a estrutura de *Drosophila* Orai PDB:4HKR, destaca os principais recursos do canal. As superfícies correspondentes a E106 e D110 são sombreadas em vermelho. O TM1-TM2 na porção extracelular do canal é marcado aproximadamente por linhas vermelhas, a estreita região apolar por linhas brancas e a região de extensão citoplasmática TM1 por linhas azuis. Os resíduos D110, E106, V102 e R91 são mostrados na representação de bastão. (b) Canal visto do lado extracelular. Cada subunidade do hexâmero é representada em uma cor diferente para destacar a organização hexamérica do canal.

Fonte: Gudlur e Hogan, 2017.

1.3.3 Proteína STIM

A proteína STIM desempenha um papel fundamental na regulação da entrada de cálcio nas células através dos canais CRAC (Liou *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Quando os níveis de Ca^{2+} diminuem no interior do retículo endoplasmático, STIM age como sensor desta depleção (Liou *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Nas concentrações de repouso do Ca^{2+} no retículo endoplasmático (RE), as proteínas STIM ocorrem naturalmente como dímeros. Em suas formas inativas, as porções citosólicas C-terminais dessas proteínas se dobram sobre si mesmas, ocultando o domínio de ligação Orai1 e impedindo o aprisionamento dentro das junções RE-MP (Muik *et al.*, 2009; Covington *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2013). Quando ocorre uma diminuição na concentração de Ca^{2+} no

lúmen do RE, isso é reconhecido pelos dois domínios EF-hand de ligação de Ca^{2+} N-terminal localizados no interior do lúmen do RE.

Após a depleção transitória de Ca^{2+} no lúmen do retículo endoplasmático (RE), ocorre uma significativa mudança conformacional na proteína STIM. Nesse processo, os terminais N luminais das proteínas diméricas se aproximam mais um do outro. Essa alteração conformacional desencadeia o desdobramento e a extensão da porção citosólica C-terminal da proteína STIM dimérica em direção ao citosol, permitindo que ela se associe ao complexo de membrana plasmática (PM) nas junções RE-MP (Ma *et al.*, 2015) (Figura 7). Os terminais C das proteínas STIM são altamente conservados em uma região conhecida como região ativadora STIM-Orai (SOAR; 344–442 em STIM1) (Yuan *et al.*, 2009).

Existem variações ligeiramente estendidas da região conhecida como região ativadora STIM-Orai (SOAR), chamadas de domínio de ativação de canal (CAD) (Park *et al.*, 2009) e pequeno fragmento ativador de Orai1 (OASF) (Muik *et al.*, 2009). O domínio SOAR representa a menor unidade funcional proteica de STIM capaz de ativar o canal CRAC mediado por Orai1. Foi demonstrado que SOAR pode ser expresso de forma isolada no citosol, ativando completamente Orai1 (Yuan *et al.*, 2009). Através de estudos cristalográficos de raios X com peptídeos SOAR purificados, revelou-se que essa unidade funcional existe como um dímero altamente estruturado (Yang *et al.*, 2012).

Cada monômero SOAR é predominantemente constituído por estruturas helicoidais, com quatro α -hélices centrais ou um total de oito α -hélices em um dímero. Essa estrutura helicoidal central é altamente conservada no C-terminal estendido do STIM1 e evidências empíricas sugerem que é crucial para a formação de dímeros (Muik *et al.*, 2009; Covington *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012). O domínio SOAR exposto na proteína STIM1 ativada fica disponível para se ligar ao canal Orai1 na membrana plasmática (MP). Essa ligação aos canais Orai1 causa um aprisionamento transiente e a ativação dos canais nas junções RE-MP (Zhou *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2015). O influxo de Ca^{2+} através dos canais Orai1 aprisionados nas junções RE-MP potencializa a desfosforilação do fator de transcrição NFAT induzida pela calcineurina, que regula a transcrição de um grande número de genes em diversos tipos de células (Kar e Parekh, 2015; Zhou *et al.*, 2015).

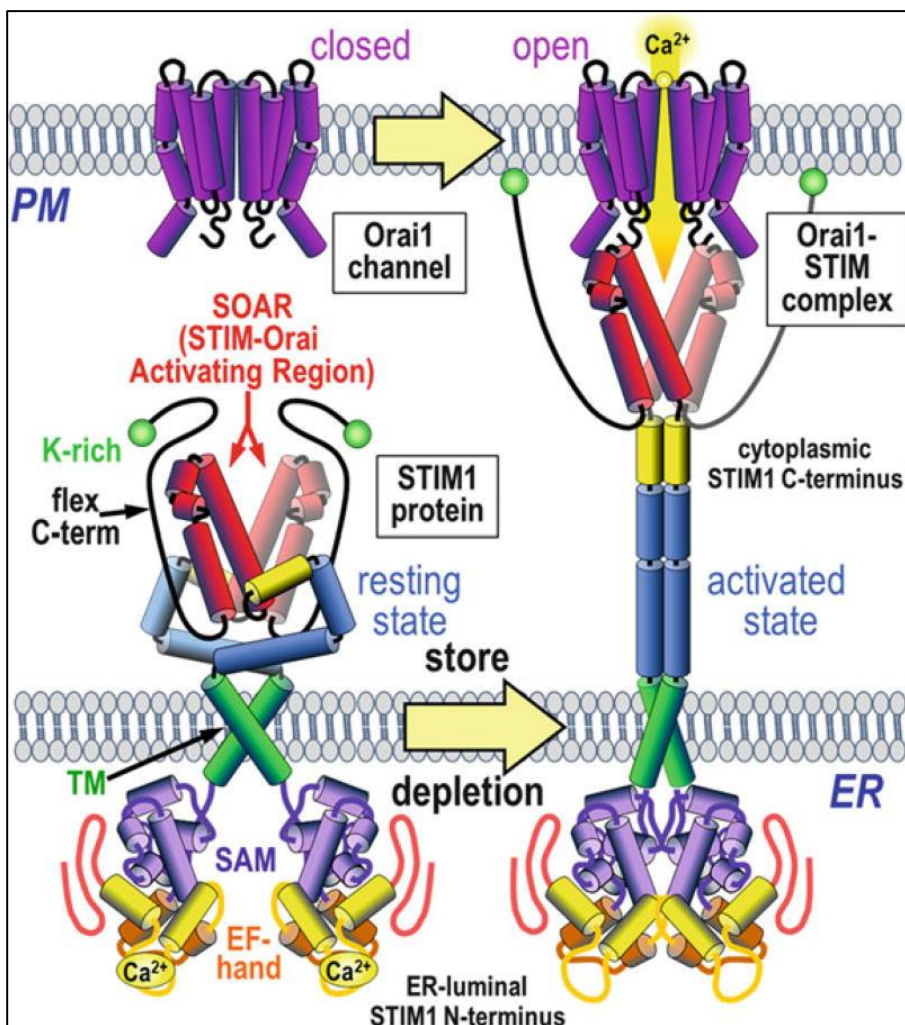


Figura 7 - Mecanismo de interação STIM1-Orai1. Envolve uma forma inativa do dímero STIM1 dobrada sobre si mesma, mantida por altas concentrações de Ca^{2+} no retículo endoplasmático (RE) através da ligação ao domínio EF-hand do STIM. A forma fechada de Orai1 pode se difundir livremente na membrana plasmática (MP). Após a depleção de Ca^{2+} no RE, as proteínas STIM se desdobram e se estendem, associando-se ao PM e ligando-se diretamente ao Orai1 para permitir a entrada de Ca^{2+} em junções RE-MP. Segmentos voltados para o citosol do STIM1, incluindo o domínio C-terminal rico em lisina (rico em K), ligam-se a fosfolípidios no MP, e os domínios C-terminal flexíveis auxiliam na proteção da região ativadora STIM-Orai (SOAR) durante condições de armazenamento repleto. Segmentos luminais/intramembranosos incluem a região transmembranar (TM) que transmite mudanças conformacionais induzidas pelo estéril- α -motif (SAM) e pelo domínio de ligação de Ca^{2+} (EF-hand).

Fonte: Nwokonko *et al.*, 2017

1.4 Canal CRAC em Helmintos

Nas últimas décadas, estudos vêm caracterizando cada vez mais detalhadamente os mecanismos moleculares associados ao canal CRAC em parasitos de relevância médica e veterinária. Isso inclui a identificação dos genes codificadores das subunidades Orai e STIM, assim como a demonstração funcional destes canais em diferentes espécies (Xu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2019).

Em *S. mansoni*, parasita causador da esquistossomose, o canal CRAC foi inicialmente analisado (Zeraik *et al.*, artigo submetido). No entanto, em helmintos como *Ascaris lumbricoides*, permanecem lacunas na caracterização molecular e no papel fisiológico desse canal relevante (Wang *et al.*, 2019). Estudos em espécies aparentadas sugerem a presença conservada de elementos do CRAC, incluindo em *Caenorhabditis elegans* (Strange *et al.*, 2007).

O nematóide *C. elegans* é um dos modelos experimentais valiosos para a compreensão molecular integrativa de processos fisiológicos, destacando-se particularmente na caracterização de mecanismos de sinalização de Ca^{2+} . Alguns estudos se concentraram no papel do canal de Ca^{2+} ativado pela liberação de Ca^{2+} (CRAC) nas funções da gônada e do intestino do verme. A sinalização oscilatória de Ca^{2+} , dependente do inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), regula a atividade contrátil da gônada e a contração muscular rítmica da parede posterior do corpo (pBoc), essenciais para a ovulação e a defecação (Lorin-Nebel *et al.*, 2007).

O genoma de *C. elegans* contém um único homólogo de STIM1 e Orai1, proteínas essenciais para o funcionamento do canal CRAC em células de mamíferos e *Drosophila*. STIM-1 e ORAI-1 de *C. elegans* são coexpressos nas gônadas e no intestino, gerando uma atividade robusta do canal CRAC quando coexpressos em células HEK293. A supressão de STIM-1 ou ORAI-1 resulta em esterilidade completa, indicando que esses genes são componentes essenciais da sinalização de Ca^{2+} nas gônadas (Gao *et al.*, 2009). A redução de qualquer uma das proteínas inibe drasticamente a atividade do canal CRAC em células intestinais, oscilações intestinais de Ca^{2+} no retículo endoplasmático (RE) (Strange *et al.*, 2007). Estudos sugerem que, embora a interação STIM-Orai tenha sido conservada de invertebrados a mamíferos, o mecanismo de ativação para Orai evoluiu consideravelmente (Kim *et al.*, 2018).

Portanto, em *C. elegans*, os canais CRAC não têm papéis essenciais em todos os processos de sinalização dependentes de IP3. Ao invés disso, sugere-se que esses canais desempenhem funções altamente especializadas e específicas das células, possivelmente agindo como um mecanismo de contingência para evitar a depleção de estoques de Ca^{2+} em condições fisiopatológicas e de estresse (Lorin-Nebel *et al.*, 2007). Acredita-se que *C. elegans* expressa canais CRAC autênticos dependentes de Orai1 e STIM1, indicando que esses canais surgiram precocemente na evolução animal. Os canais CRAC em *C. elegans* possivelmente atuam como um mecanismo de proteção contra a depleção de Ca^{2+} em condições adversas (Kim *et al.*, 2018).

Ainda não há estudos sobre o canal CRAC em *A. lumbricoides*, porém, na literatura encontramos um estudo sobre o helminto do gênero *ascaris*, o *Ascaris suum*, cuja atenção foi direcionada ao íon cálcio (Ca^{2+}), especialmente em relação à dietilcarbamazina (DEC), um anti-helmíntico utilizado no tratamento da filariose linfática, observou-se que a DEC exerce efeitos estimuladores em parasitas nematóides ascarídeos. A expressão gênica identificada por meio de PCR no intestino de *Ascaris suum* sugere a sensibilidade desse órgão à DEC. A análise comparativa de sequências de aminoácidos dos canais TRP de diferentes parasitos reforça a possibilidade de influência da DEC no intestino de *Ascaris*. A utilização de Fluo-3AM como indicador de Ca^{2+} evidenciou aumentos instáveis no sinal de Ca^{2+} em resposta à DEC, com a inibição efetiva por La^{3+} e inibidores de canais TRP. Essas descobertas sublinham a importância do intestino como alvo da DEC, ampliando a compreensão dos mecanismos de ação e potenciais interações com outros anti-helmínticos (Williams *et al.*, 2022).

Estudos realizados por integrantes do grupo de pesquisa do nosso laboratório (manuscrito submetido) demonstraram diferenças significativas observadas na sinalização celular de cálcio por esta via entre *S. mansoni* e *H. sapiens*, que foram atribuídas à porção C terminal da proteína STIM. SmSTIM e SmOrai (STIM e Orai de *S. mansoni*) foram clonados em vetores de mamíferos e expressos em linhagens celulares HEK293, com a finalidade de avaliar sua funcionalidade como um canal de cálcio. Quando expressos em células de mamíferos, SmSTIM localiza-se ao longo do RE e perto da membrana plasmática em células em repouso, e ativa constitutivamente o SmOrai independente da depleção de cálcio induzida por TG, sugerindo um mecanismo regulatório diferente do observado para humanos, em que a ativação do canal depende da depleção de cálcio. Apesar desta diferença, os

canais de *S. mansoni* e humanos parecem empregar mecanismos semelhantes, pois STIM1 humana consegue ativar SmOrai, e uma quimera do domínio SmSTIM ER-luminal e do domínio citoplasmático do STIM1 humano desencadeia o influxo de cálcio dependente da ativação com tapsigargina (TG). Por outro lado, SmSTIM é incapaz de ativar Orai humana, mesmo após ativação com TG sugerindo que há diferenças no mecanismo de abertura do canal entre células de mamíferos e células de *S. mansoni*

Existe uma região específica na porção C-terminal de STIM que é significativamente diferente entre parasitas helmintos do filo dos platelmintos e do filo nematelmintos. Os platelmintos apresentam nesta região cerca de 70 resíduos a mais que os nematelmintos. Buscamos avaliar com neste trabalho, se apesar da diferença sequencial, o mecanismo de ativação do canal CRAC seria semelhante entre *A. lumbricoides* e *S. mansoni*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo geral caracterizar um canal de cálcio inédito no nematóide *Ascaris lumbricoides*, o canal CRAC (calcium release-activated calcium channel), e comparar o mecanismo de ativação deste canal com o canal humano e de *S. mansoni*.

2.1.1 Objetivos Específicos

- 1) Analisar e comparar, através de ferramentas bioinformáticas, as sequências proteicas de STIM e Orai de *Ascaris lumbricoides*, *Schistosoma mansoni* e *Homo sapiens*;
- 2) Clonar as proteínas STIM e Orai de *Ascaris lumbricoides* em plasmídeos para expressão em bactérias e células de mamíferos;
- 3) Avaliar a localização subcelular de STIM e Orai de *A. lumbricoides* em células de mamíferos e formação de puncta mediante estímulo com tapsigargina;
- 4) Verificar a capacidade de AIOrai ser ativada por HsSTIM;

5) Avaliar possíveis mudanças na conformação e estabilidade térmica da proteína na presença e ausência de cálcio através de dicroísmo circular.

3. METODOLOGIA

3.1 Análise comparativa das sequências proteicas de STIM e Orai de *Ascaris lumbricoides*, *Schistosoma mansoni* e *Homo sapiens*

Foi realizada a busca de sequências das proteínas STIM e Orai de *H. sapiens* no National Center for Biotechnology Information (NCBI) e dos ortólogos de *A. lumbricoides* e *S. mansoni* na base de dados *WormBase Parasite*. Após a identificação das sequências, procedemos com o alinhamento utilizando o programa MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation), que nos permitiu comparar as sequências das três espécies, identificar regiões conservadas e avaliar a homologia entre as proteínas STIM e Orai. Posteriormente, utilizamos o PFAM (Protein Family) para a predição de domínios das proteínas.

3.2 Clonagem de STIM e Orai de *A. lumbricoides*

Genes sintéticos de STIM e Orai de *A. lumbricoides*, denominados AISTIM e AIOrai, foram adquiridos (FastBio/Genscript) em vetor pcDNA3.1 e subclonados em vetores para expressão em células de mamíferos. AISTIM foi subclonado em vetor pCMV6-XL5, nos sítios HindIII e XhoI, fusionada à proteína EGFP no N terminal e AIOrai foi subclonada no vetor MO91, nos sítios BamHI e XhoI, fusionada à proteína mCherry no N terminal. Após análise de restrição, foi realizada a separação do inserto e vetor através de eletroforese em gel de agarose, e o isolamento e a purificação dos fragmentos de DNA foram conduzidos utilizando o kit Promega Wizard™ SV Gel and PCR Cleanup System, seguindo as orientações do fabricante.

O fragmento de DNA foi inserido no vetor através de ligação com a enzima T4 DNA ligase, formando o plasmídeo recombinante contendo o gene de interesse. As linhagens de bactéria *Escherichia coli* (DH5α) competentes foram transformadas, a fim de captarem o plasmídeo recombinante. Após incubação com os plasmídeos por 30 minutos, as bactérias foram submetidas a um choque térmico em banho-maria à 42°C durante 50 segundos, foi acrescentado em 200 µL de meio de cultura LB

(Luria-Bertani) e logo após foi devolvido ao gelo por 2 minutos. Na sequência foram incubadas sob agitação por 1 h a 37°C e plaqueadas em meio LB agar contendo ampicilina (50 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 h. As colônias brancas, clones positivos, foram selecionadas e, após crescimento por cerca de 16 h a 37 °C em meio LB contendo ampicilina (50 µg/mL), o DNA plasmidial dessas células foi extraído utilizando-se o kit Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification Systems (Promega) de acordo com as orientações do fabricante.

A confirmação da presença do inserto de interesse foi realizada por análise de restrição, utilizando-se as enzimas BamHI e XhoI para AIORAI em M091 e HindIII e XhoI para a digestão de AISTIM em pCMV. A reação de digestão foi preparada e incubada em estufa por 3h e a presença do inserto foi verificada por eletroforese em gel de agarose.

3.3 Cultivo de células HEK293

O cultivo de células HEK293 foi feito utilizando o meio de DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, antibióticos e antimicótico, (penicilina, estreptomicina e anfotericina B) (Sigma-Aldrich), conforme as recomendações dos fornecedores.

As células HEK293 foram adicionadas em frascos de cultura celular, sendo necessário realizar a aspiração do meio antigo, lavagem com PBS e subsequente adição de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) para o desprendimento celular. Após a neutralização da tripsina com meio de cultura, as células foram contadas e semeadas em novos frascos de acordo com a densidade celular desejada. O cultivo e a manutenção das células ocorreram em incubadoras, com atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C.

Durante o cultivo, os meios de cultura foram substituídos regularmente, geralmente a cada 2-3 dias, e o crescimento celular foi monitorado por microscopia óptica. Subcultivos foram realizados quando as células atingiram uma confluência de 70-80%, envolvendo as etapas de aspiração do meio antigo, lavagem com PBS, tratamento com tripsina-EDTA, neutralização, contagem celular e semeadura em novos frascos. Durante todas as manipulações celulares, foram adotadas técnicas assépticas para garantir a integridade dos experimentos. Além disso, para fins de preservação e armazenamento, as células HEK293 foram congeladas em meio contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenadas em freezer a -70 °C.

3.4 Transfecção de células HEK293

As células HEK293 foram adicionadas em placa de seis poços, em uma densidade de 0.3×10^6 células por poço e transfectadas com 1 μg de EGFP-AISTIM e 1 μg mCherry-AIOrai, usando 10 μl de lipoafectamina 2000 (Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante. Após 24 horas da transfecção, as células foram transferidas para placas de petri com fundo de vidro para observação em microscópio confocal. As imagens foram adquiridas 48 horas após a transfecção em microscópio confocal Zeiss 710. Foi utilizada uma objetiva Plan-Apochromat 63x/1.40 e as amostras foram escaneadas sequencialmente com o laser de argônio (excitação em 488 nm), para visualizar STIM fusionada à GFP, e com o laser de hélio-neônio, em 543 nm, para detectar Orai fusionada à mCherry.

3.5 Expressão e purificação de STIM EF- SAM de *A. lumbricoides*

A região correspondendo ao domínio EF-SAM de AISTIM foi subclonada no plasmídeo para expressão bacteriana, pET28a+, pela aluna de iniciação científica Kerolayne de Oliveira da Silva.

Para permitir a expressão da proteína, o plasmídeo foi transformado na linhagem de expressão *E. coli Rosetta DE3*. Uma colônia derivada dessa placa foi cultivada em 5 mL de meio LB contendo canamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após 16 horas a 37 °C, sob agitação a 150 rpm, o pré-inóculo resultante foi diluído em 1 L de meio de cultura LB, mantendo o mesmo antibiótico, numa proporção de 1:50. Ao atingir a densidade óptica de 0,7-0,8 a 600 nm, a expressão da proteína foi induzida pela adição de IPTG (0,4 mM). As células foram então incubadas por 16 h a 18 °C, sob agitação a 150 rpm. A confirmação da expressão da proteína de interesse foi posteriormente realizada através de SDS-PAGE (15%).

Após a fase de expressão, a cultura foi centrifugada a 8.000 g por 30 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em 30 mL de tampão Tris 25 mM, pH 8,0, contendo 150 mM de NaCl e 5% de glicerol (Tampão A). Em seguida, a suspensão

celular foi submetida à ruptura por sonicação em 10 ciclos de 25 segundos, com intervalos de 35 segundos em banho de gelo.

A separação das proteínas solúveis do pellet foi realizada por centrifugação a 8.000 g por 20 minutos a 4 °C. Posteriormente, a cromatografia de afinidade foi conduzida, onde 20 ml do sobrenadante foi incubado em uma coluna contendo aproximadamente 3 mL de resina de Ni-NTA (Qiagen), previamente equilibrada com tampão A, por 30 minutos a 4 °C. Após a passagem do sobrenadante, a resina foi lavada, e a lise celular foi realizada com o mesmo tampão. A etapa subsequente envolveu cromatografia de exclusão molecular usando uma coluna Superdex 75 acoplada ao sistema AKTA go (Cytiva). Amostras de 1 mL foram aplicadas, com alíquotas de 1 mL sendo coletadas. A eluição das frações de interesse foi monitorada pela absorbância a 280 nm. Amostras foram retiradas em cada etapa do processo para análise por SDS-PAGE. A determinação da concentração proteica foi realizada através de medidas de absorbância a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção calculado a partir da sequência de aminoácidos das proteínas, com auxílio do programa ProtParam.

3.6 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Utilizando um espectropolarímetro Jasco J-815, obtivemos espectros de dicroísmo circular (CD) na região far-UV (200-260 nm). Preparamos duas amostras para este experimento: a amostra APO, contendo a proteína EF-SAM AISTIM em uma concentração de 10 µM em tampão Tris 50 mM pH 8,0, e a amostra com cálcio, preparada com a proteína EF-SAM AISTIM na mesma concentração e tampão, porém incubada com 5 mM de CaCl₂. Ambas as amostras foram colocadas em uma cubeta com caminho óptico de 1 mm, e os espectros foram obtidos como uma média de seis varreduras na faixa de comprimento de onda entre 200 nm e 260 nm, a uma velocidade de 100 nm/min.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises de bioinformática das sequências das proteínas STIM e Orai em *S. mansoni*, *A. lumbricoides* e *H. sapiens*

Iniciamos o estudo do canal CRAC de *Ascaris lumbricoides* pela busca das proteínas formadoras deste canal (STIM e Orai) em base de dados específica de parasitos (WormBase Parasite), uma vez que estas não foram identificadas no NCBI.

Identificamos uma isoforma de cada proteína e as sequências foram analisadas através do Pfam (Protein FAMILies), um banco de dados que fornece anotações sobre famílias de proteínas, incluindo informações sobre domínios conservados. Esse software é amplamente utilizado para análise de sequências proteicas e predição de domínios. Análise da sequência de AISTIM revelou a presença de domínios-chave de STIM, como o domínio EF-SAM e a região de interação com Orai (representada pelas regiões CC2 e CC3 na Figura 8 A), indicando funções possivelmente preservadas ao longo da evolução (Figura 8 A). AIOrai apresentou a predição de quatro regiões transmembrana, o mesmo reportado para a ortóloga humana (Figura 8 B).

A) Predição de domínios STIM *A. lumbricoides*

```
> Ascaris_lumbricoides - STIM
MFARRIDFRLKRVMCPRWGTHLELLSASAPLIASVVVITADDEKFRDPEGYAAIMQLHRQM
DDDHSGSIDRFESNDFLKEDMKFGGSDREKREKAFHHNDEQITVDDLWEAWFGSEERAW
TTAEVVAWLENSVRLPQYSNNLIVKNVDGRALPRMAVANSTYLATELGIKNAVHKHKIHL
KALDVVLFGFSGDGSSRMKDIALSILLCVLIAVLVLYKRQRSRSRNEMEQLTSKLRQLKS
MESDFEDVQQKFEERKKRQSVSEAIVAENAQMETLRSQLMEAERLLESSSSAPLALQPL
LRRTCELEMSYVGQQRLECIAEMREAIELIDKLRKKQSSSLMSSIKLATGGSTGTDQVDSR
IFSLKARMEKISLAMEECQQRWIEISLCGFPLMVQPNGAELTFMGHTMPASGSSHLPRT
PSMCSSFYRSSGICSTLATSAPPSSYSSASALSTLALLDTSVAPKRPTTVFSLTSASTSRL
SSSSHSHSSSSEDRPYPLPSPEFQLLTSAEHRNPGSTLYGALENRIQQQTGTLRFFAH
EYFFGMRLSRSLHPARFCSS
```

Legenda predição STIM:

EF-hand, SAM, TM-hélix,
CC1, CC2, CC3.

B) Predição de domínios Orai *A. lumbricoides*

```

>Ascaris lumbricoides Orai
MVSSSPLHLDTAPRRKGITEAYPLSGWITDVKLASRLAASNRMMLNESRSANDICTNAFE
GGTRHDFMHEHDDVKSLQLQESRHRGELTILEKYRYDLSRAQLKASSRTSALLAGFAMVAL
VELQYESNTPPYLLILLGVVTTLLVSVHLLALMMSTCILPYIEANGCTQDSPHIRLKFYI
DLSWLFSTCIGLVFLVEIGVIFVKFNAVNYELLAAYITTAMLIPVLIIFTVFSCLIHKN
RFIHSMDRVDTKVNDLQKFLSENEVAVALPNATSVQRHLVGAGLQGITILR

```

Legenda predição Orai:

TM-hélix 1, TM-hélix2, TM-hélix3,
TM-hélix 4.

Figura 8 : Predição de domínios de proteínas STIM *A. lumbricoides* e Orai *A. lumbricoides*.

Fonte: PFAM (Protein FAMILies).

As sequências de AISTIM e AIOrai foram comparadas aos ortólogos de *S. mansoni* e *H. sapiens* através de alinhamento múltiplo, realizado com o software Muscle (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Figura 9 A) . A análise do alinhamento de STIM mostra que apesar de possuírem regiões bastante divergentes, o domínio EF-SAM e a região de interação com Orai (SOAR) são conservados. O alinhamento da proteína Orai mostra maior conservação nas regiões transmembranares e maior divergência nos domínios N e C terminais (Figura 9 B).

A) Alinhamento STIM

	EF-SAM		
S. mansoni	-----MICYI-----FGILE-----CICSLFSPVCSIDICSATDEILCFYKILSYEAIK	45	
A. lumbricoides	MFARRIDFRILKRVMCPR-----WCTHL-----ELLSASAPLIAVVTITADDEK---FRDPEGYAAM	54	
H. sapiens	MDVVCVRLALWLLWGPLLHQCOSLSHSHSEKATGCSGANSSEETAAEFCRIDKPLCHSEDEKLSFEAVR	69	
	1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80		
S. mansoni	DLHRNLDGDKNGEVDHSETEKFLRKEFNP--GDAAKSRML-NSDDPLISLITDLWQWRRNPAFNWTVRDTTQWLVNLVD	122	
A. lumbricoides	QLHRQMDDHSGSIDRFEENDFLKEDMKFGGSDREKREKAFHNNDEQITVDDLWEAWFGSEERAWTTAEVVANLENSVR	134	
H. sapiens	NTHKLMDDDANGVDVVEESDEFLREDLNY--HDETVKHSIF-HGDKLISVEDLWKAKKSEVYVNWTVDEVVQNLITYVE	146	
90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160		
S. mansoni	LFOYADLFROHNLGDRSLPRLAMQMSYLVVDVLGIONPIHKKKLMRLALDIILFGPPROPVLVSGNVPILVTLSIGLLCS	202	
A. lumbricoides	LPOYSNNLIVKNVDCRALPRMAVANSTYLATELGIKNAVHKKHILKALDVVLFQFS---GDGSSRMKDIALSILLCV	209	
H. sapiens	LFOVEETFRKLQLSGHAMPRLAVTNTMTGTVLKMTRDRSHROKQLKALDVVLFQPF---LITRHNHLKDFMLVSVVSI	222	
170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240		
S. mansoni	FVFSFHWFYHTSFFSEKN--SVGENQEKLNVAEQTLKQLRRLLDVEQLRQTLNAYEINQHFASSSSSAPKGMKRDNLSS	280	
A. lumbricoides	LIAVLVLYKRRRSRSEKQLTSLKRLQKSMESDFEDVQKFEERKKRQSVSEIVAEN-----KRLRDEINLAK	270	
H. sapiens	GVGGCWFAYIINRYSEKHMKMMKDLQGLHRAEQSLDQLERLHKAQEEHRTVEVEKVVHLE-----KRLRDEINLAK	294	
250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320		
S. mansoni	PHLKSMEALNEDSLNTRKQSYDHSSYIPSSITEFSLTDLCNDSLHNSSSNNNNIYANDPLTSDQIRLQCRKILNLKG	360	
A. lumbricoides	QEARLKELEKTEENERSRQ-----KYAEELQVREALRKAKELESSE	291	
H. sapiens330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400	339	
	SOAR		
S. mansoni	RNYGNFCSSIALSRNPKNYHLDEPHVELKHWLQVYIELELKRICEKRMKAEEKLDFARQSKRFMRKRYGIFGCVRLV	440	
A. lumbricoides	S--APL-----ALPQLLRRCLEMSYVGOORLECIAEMREATELIDKLRKQSSLMSSKLA	347	
H. sapiens	SWYAPE-----ALGKWLQLTHEVEVQYINIKKQNAEKQLLVAKGAEKIKKRNPLFGTFHVA	397	
410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480		
S. mansoni	N--ATNLDLENRLISAKQALDQLEIEVQERINRWSRIEALTGFIHT-----DIHNOYAKSTICETT-----	501	
A. lumbricoides	TGGSTCTDQVDSRIFSLKARMEKISLAMEEQQRWIEIESLCGFPLMVCPN-----GAELTFMGHMPASGSSHLF	418	
H. sapiens	H--SSSLDDVDHKKILIAKQALSEVTAALRELRHWQIEILCGFQIVNNPGIHSLVAAALNIDPSWMGSTRPNPAHFIMTD	475	
490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560		
S. mansoni	-----KSIHCSDMYR-----VCNCS	517	
A. lumbricoides	-----RTPMCSFFYR-----SSGICH-----LATSAPPFSYSSAS	449	
H. sapiens	DVDDMDEEIVSPLSMQSPSLQSSVRRLTEPQHGLGSDRLTHSDSESSLHMSDRQRVAPKPPQMSRAADEALNAMTSG	555	
570.....580.....590.....600.....610.....620.....630.....640		
S. mansoni	-----MKSSDSDRLSSMIE-----EISLESNRFKSTSNGLVNDFD-----	553	
A. lumbricoides	-----ALSTLALLDTSVAPKRPTVFSLTSAN-----TSRLSSSHSSSSSSEDRFPF-----	498	
H. sapiens	SHRLLEGVHPGSLVEKLPDSPALAKKALLALNHEGLDKAHLMLSPSPAPPGGSPHLDSRSHSPSPDPDTPSPVGDSSRA	635	
650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720		
S. mansoni	-----CHENKEIFNLKDSFQSNSETADTFRTSLERNVSVFRPFATLWRRKTKSGRGKADSK-----	610	
A. lumbricoides	LFSPSEFQLLTSAEHRNPGSTLYGALENRIQQOQTLRFFAHEYFFGMRLSRSLHPARFCS	560	
H. sapiens	LQASRNTRIPHLAGKRAVAEEDNGSIGEEEDSSPGRKKFFLKIFKKPLKK-----	685	
730.....740.....750.....760.....770.....780..		

B) Alinhamento Orai

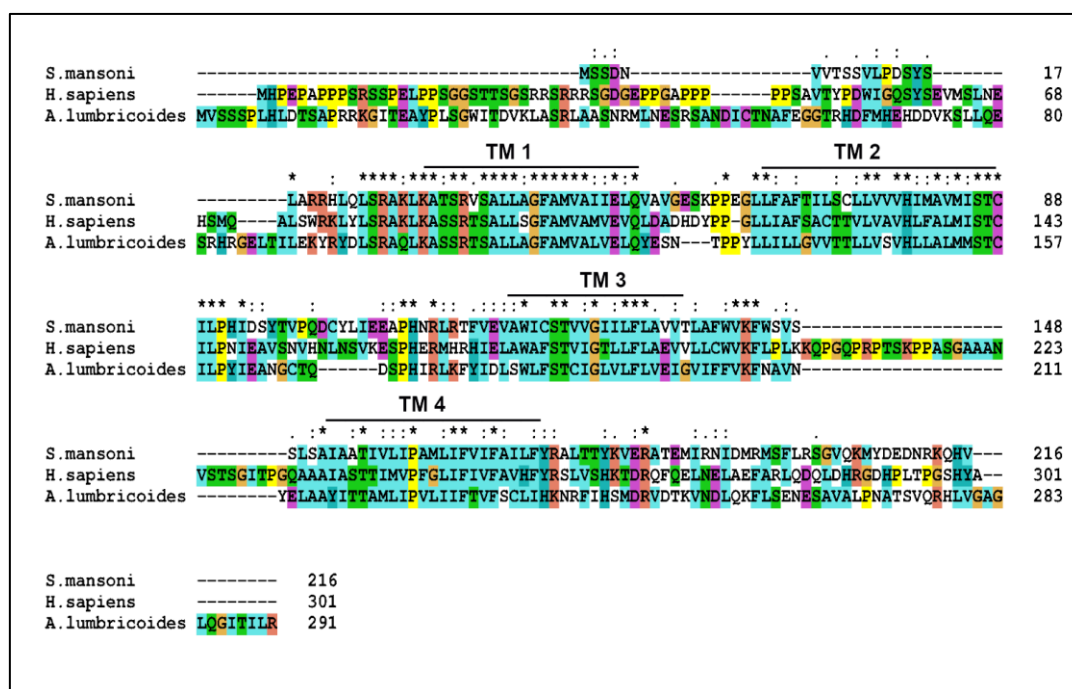


Figura 9: Alinhamento das seqüências de aminácidos das proteínas STIM (A) e Orai (B) de *A. lumbricoides*. Fonte: Software MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation).

Em suma, os resultados destacam a importância de investigar as diferenças e similaridades nas seqüências dessas proteínas em diferentes organismos, contribuindo para uma compreensão mais abrangente dos processos biológicos envolvidos na regulação do cálcio.

4.2 Clonagem das proteínas STIM e Orai de *A. lumbricoides*

Os genes sintéticos correspondentes às proteínas STIM e Orai de *A. lumbricoides* foram adquiridos comercialmente e vieram inseridos em plasmídeo pCDNA3.1, para subcloná-los nos vetores de expressão, estes plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrição específicas e ligados em vetor digerido com as mesmas enzimas. A Figura 10 ilustra a eletroforese em gel de agarose 0,8% resultante da análise de restrição dos vetores de expressão, pCMV para AISTIM e MO91 para AIOrai, confirmando a presença dos insertos do tamanho esperado, AISTIM com 1695 pb e AIOrai com 888 pb.

Identificação dos Clones Recombinantes

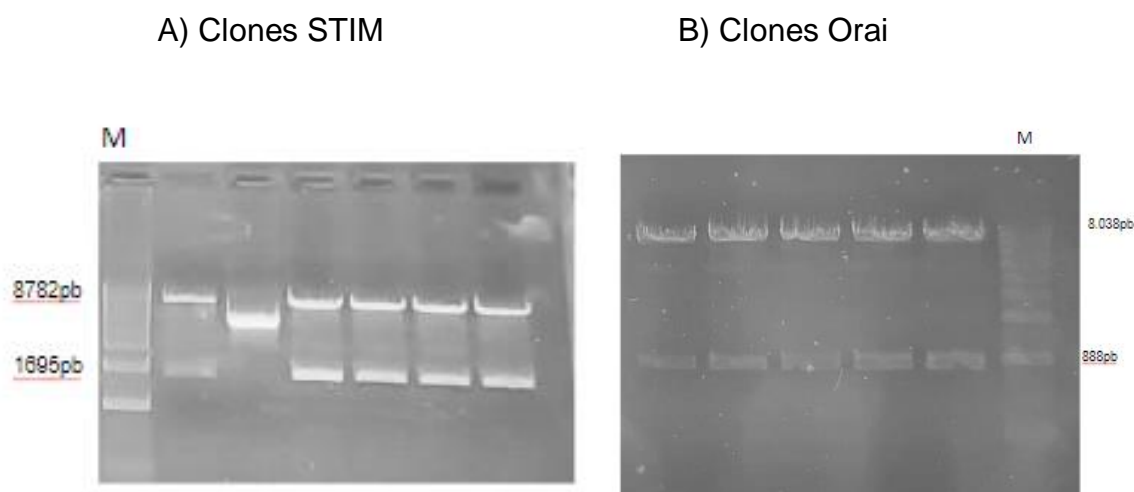


Figura 10: Análise de restrição de AISTIM e AIOrai em vetores de expressão de mamíferos. Eletroforese em gel de Agarose 0,8%. A) Vetor EGFP-pCMV (8782 pb), Inseto AISTIM (1695pb); B) Vetor mCherry-Orai M091 (8038 pb), Inseto AIOrai (888pb).

Esses resultados confirmam a eficácia do processo de clonagem na introdução dos genes de interesse nos vetores plasmidiais e na obtenção de células contendo os genes de STIM e ORAI de *A. lumbricoides* para estudos subsequentes sobre sua função e regulação.

4.3 Transfecção e expressão em células HEK293

Desde a sua descoberta na década de 1970, as células HEK293 têm sido uma ferramenta fundamental em pesquisa biológica, oferecendo uma gama de aplicações devido à sua capacidade de serem facilmente manipuladas geneticamente e sua versatilidade como sistema modelo (Wang *et al.*, 2018).

A expressão de proteínas STIM e Orai de *H. sapiens* em células HEK293 transfectadas tem sido amplamente explorada em grupos de estudos, fornecendo resultados valiosos sobre a regulação do cálcio intracelular e a função dos canais CRAC (Wang *et al.*, 2009).

Na ausência de células de *A. lumbricoides*, recorreremos às células de mamíferos, HEK293, como um modelo de estudo para avaliar a funcionalidade do

canal CRAC de *A. lumbricoides*. Iniciamos com a transfecção das proteínas, HsSTIM e HsOrai, como controle positivo de nosso protocolo de transfecção.

A Figura 11 ilustra que as células HEK293 ao serem transfectadas com EGFP-HsSTIM e mCherry-Orai mostraram a localização esperada para estas proteínas. HsSTIM, marcada em verde por estar fusionada à EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) mostra marcação típica de proteína localizada no retículo endoplasmático (Figura 11 A), e HsOrai, marcada em vermelho (fusionada à proteína mCherry), apresenta marcação compatível com proteínas localizadas na membrana plasmática (Figura 11 B).

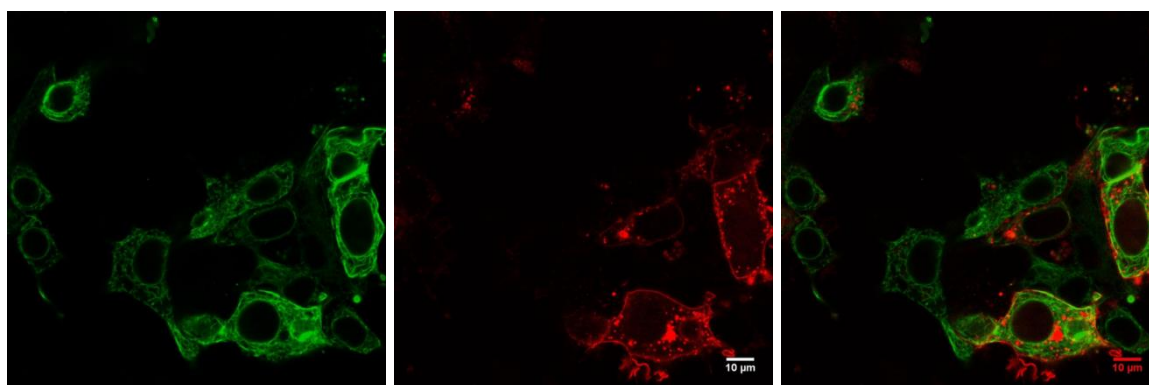
A) STIM *H. sapiens*B) Orai *H. sapiens*C) STIM e Orai *H. sapiens*

Figura 11: Células HEK 293 transfectadas com as proteínas STIM e Orai de *H. sapiens* (controle). (A) Células HEK293 coexpressando EGFP-HsSTIM (Verde) e (B) mCherry-HsOrai (Vermelho). C) Canais verde e vermelho sobrepostos.

Fonte: Autor

A coexpressão de EGFP-HsSTIM e mCherry-HsOrai como mostra a Figura 11, oferece uma ferramenta valiosa para investigar a interação entre essas proteínas e entender sua função na regulação do cálcio intracelular e nos permite visualizar a interação entre essas proteínas em tempo real.

As células HEK293 transfectadas com AISTIM e AIOrai apresentaram uma localização subcelular diferente da observada para o controle (transfectado com as proteínas humanas), especialmente AISTIM, que mostrou um sinal de fluorescência bastante fraco, e as células transfectadas mostraram sua morfologia alterada, arredondada, diferente do aspecto das células saudáveis (Figura 12 A). AIOrai mostrou uma localização mais próxima de HsOrai, com marcação visível na

membrana plasmática e vesículas no interior das células, provavelmente provenientes da superexpressão da proteína (Figura 12 B).

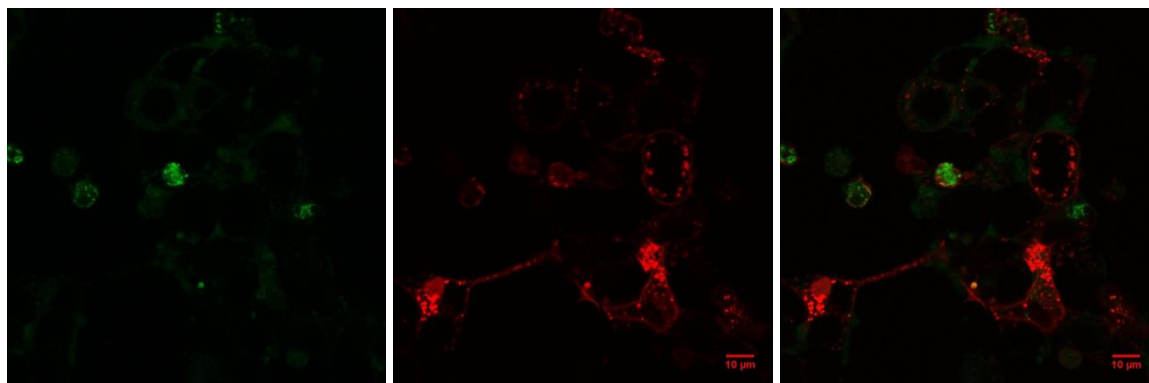
A) STIM *A. lumbricoides*B) Orai *A. lumbricoides*C) STIM e Orai *A. lumbricoides*

Figura 12: Células HEK 293 transfectadas com as proteínas STIM e Orai de *A. lumbricoides*. (A) Células HEK293 coexpressando EGFP-AISTIM (Verde) e (B) mCherry-AIOrai (Vermelho). (C) Sobreposição dos canais verde e vermelho.

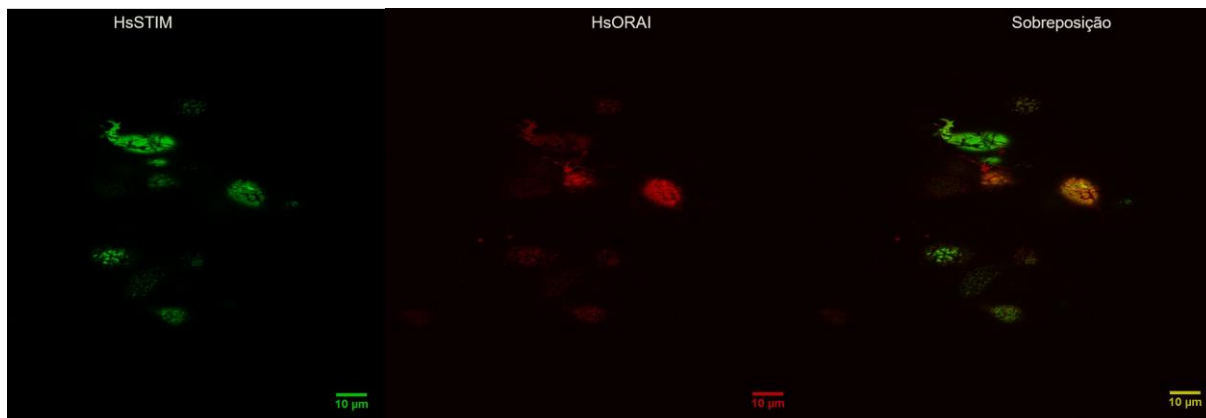
Fonte: Autor.

Possivelmente a expressão de AISTIM em células de mamíferos teve um efeito tóxico e não conseguimos prosseguir com estudos funcionais do canal com esta proteína. Desta maneira, optamos por combinar AIOrai com HsSTIM, de forma a verificar se a STIM humana seria capaz de ativar o canal formado por Orai de *A. lumbricoides*.

Para avaliar a ativação de AIOrai por HsSTIM, células HEK293 foram cotransfectadas com mCherry-AIOrai e EGFP-HsSTIM e estimuladas com tapsigargina, um inibidor específico da bomba SERCA, que promove a diminuição da concentração de cálcio do RE e conseqüentemente a abertura do canal CRAC.

Pode-se observar que no controle positivo, as células transfectadas com as proteínas humanas, houve formação de puncta, conforme esperado, mediante estímulo com TG (Figura 13 A). A coexpressão de HsSTIM e AIOrai também foi capaz de induzir a formação de puncta após incubação com TG, indicando que Orai de *A. lumbricoides* é capaz de responder à depleção de cálcio, sinalizada por STIM humana e que estas proteínas se colocizam em agregados proteicos denominados puncta (Figura 13 B).

A)



B)

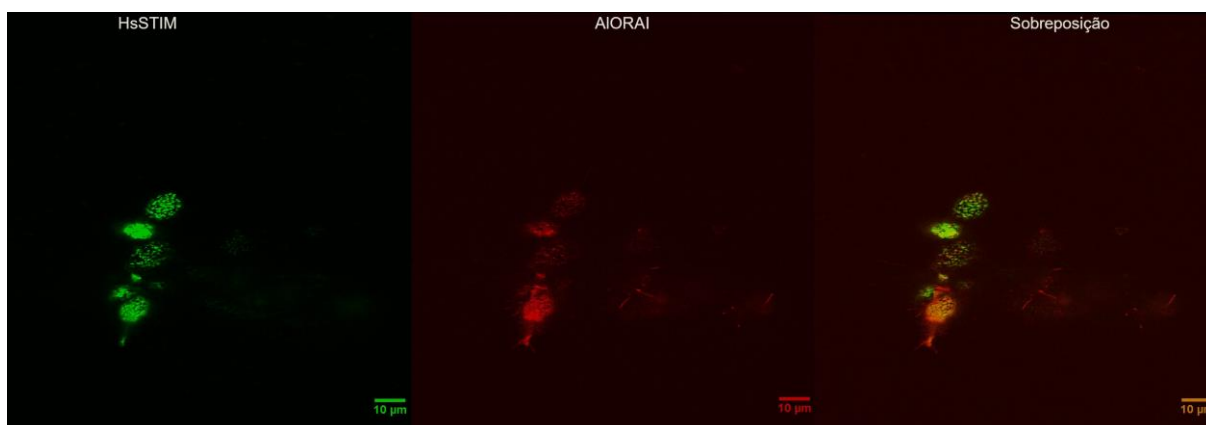


Figura 13: Imagens de microscopia confocal das células HEK293 após 10 minutos de incubação com 1 μ M de TG. (A) Controle positivo, células transfectadas com STIM e Orai de *H. sapiens* incubadas com tapsigargina apresentando formação de puncta. (B) Células transfectadas STIM *H. sapiens* e Orai de *A. lumbricoides* apresentando formação de puncta.

Um estudo relevante para o entendimento desse trabalho são as descobertas de Walter e Ron (2011), publicado na revista *Science*, ele destaca o papel fundamental da resposta a proteínas desdobradas (unfolded protein response - UPR) na regulação da homeostase celular em resposta ao estresse do RE.

Podemos incorporar essas descobertas em nosso trabalho ao enfatizar que a formação de puncta observada após o estímulo com TG pode ser uma manifestação da ativação da UPR, que visa restaurar a homeostase proteica ao reduzir a carga de proteínas mal dobradas ou agregadas no RE. Além disso, podemos discutir as implicações clínicas desses achados, destacando como a disfunção na regulação da

UPR e na formação de puncta pode contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e distúrbios metabólicos associados ao estresse do RE.

4.4 Expressão e purificação AISTIM EF-SAM

Diante da dificuldade em expressar a proteína AISTIM inteira em células de mamíferos, optamos por fazer uma construção parcial, compreendendo apenas o domínio EF-SAM (localizado no lúmen do RE), para expressão e purificação em bactérias, e verificação da ligação ao cálcio por este motivo, indicando que esta proteína possa ser um sensor de cálcio funcional.

O protocolo de clonagem, expressão e purificação de AISTIM EFSAM foi realizado em colaboração com a aluna de Iniciação Científica do nosso grupo de trabalho Kerolayne de Oliveira da Silva.

Após a expressão bem-sucedida da proteína AISTIM EF-SAM, foi iniciado o protocolo de purificação com o objetivo de obter amostras de alta pureza, visando análises biofísicas futuras. Na fase inicial do processo, após a lise das células, constatou-se a presença da proteína de interesse na fração solúvel, identificada no sobrenadante após a centrifugação (Figura 14, coluna 1). Estas frações solúveis foram então submetidas às etapas subsequentes de purificação.

Inicialmente, foi utilizada a cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA, um método amplamente empregado na purificação de proteínas que possuem tags de afinidade de hexahistidina (codificada no vetor de expressão bacteriano pET28a+). Em seguida, procedeu-se com a cromatografia de exclusão molecular, utilizando uma coluna Superdex 75. Esta etapa visa separar as proteínas com base em seus tamanhos moleculares, permitindo a obtenção de frações mais puras e homogêneas da proteína de interesse.

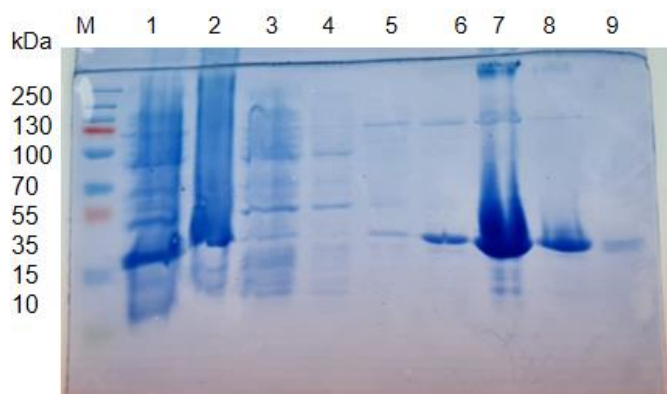
A cromatografia de afinidade demonstrou uma alta eficiência ao ligar a proteína de interesse, AISTIM EF-SAM. Essa ligação foi realizada devido à afinidade específica na extremidade N-terminal da proteína aos íons níquel (Ni^{2+}) presentes na resina de Ni-NTA. Esse processo permitiu a retenção seletiva da AISTIM EF-SAM na coluna de cromatografia, enquanto a maioria das outras proteínas não ligadas foi eluída. Essa observação foi evidenciada pela presença mínima de AISTIM EF-SAM na fração não ligada (conforme ilustrado na Figura 14 A, coluna 3).

A lavagem inicial foi conduzida exclusivamente com tampão A (Tris 25 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, 5% glicerol), seguida por duas etapas subsequentes de lavagem,

onde utilizamos o mesmo tampão sem imidazol (lavagem 1) e acrescido de 10 mM (lavagem 2) e 40 mM de imidazol (lavagem 3, Figura 14 coluna 6). Pode-se observar que a lavagem com 40 mM de imidazol ocasionou perda de proteína, mas foi importante para a obtenção de uma amostra com maior grau de pureza. A eluição foi realizada com tampão acrescido de 500 mM de imidazol.

Posteriormente, realizamos a cromatografia de exclusão molecular para remoção dos contaminantes adicionais, imidazol e possíveis agregados proteicos. A presença de apenas uma banda no gel de SDS-PAGE, nas frações eluídas desta segunda etapa de purificação sugere um elevado grau de pureza da proteína AISTIM EF-SAM (Figura 14 B).

A)



B)

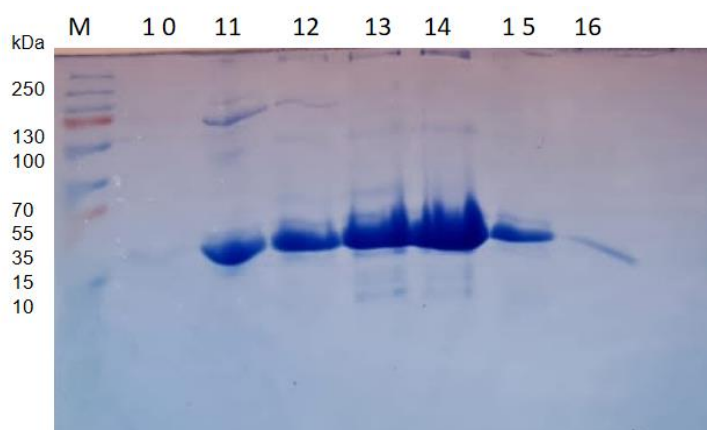


FIGURA 14: Análise SDS-PAGE da Purificação da Proteína AISTIM EF-SAM. A) Purificação por cromatografia de afinidade. M: Marcador Molecular; 1: Sobrenadante; 2: Pellet; 3: Não-ligado; 4: Lavagem 1 com tampão A; 5: Lavagem 2, tampão A com 10 mM de imidazol; 6: Lavagem 3, tampão A com 40 mM de imidazol; 7: Eluição 1; 8: Eluição 2; 9: Eluição 3. B) Análise das frações obtidas através da cromatografia de exclusão molecular. M: Marcador

Molecular; 10: Fração 10; 11: Fração 11; 12: Fração 12; 13: Fração 13; 14: Fração 14; 15: Fração 15; 16: Fração 16.

A análise do perfil de eluição de AISTIM EF-SAM na cromatografia de exclusão molecular revela dois picos principais da mesma proteína entre as frações correspondentes aos volumes de eluição de 10 a 15 mL (Figura 15), que pode ser correspondente à dímeros e monômeros de AISTIM EF-SAM. O pico utilizado nos experimentos subsequentes foi o de maior intensidade, correspondendo às frações 14 e 15.

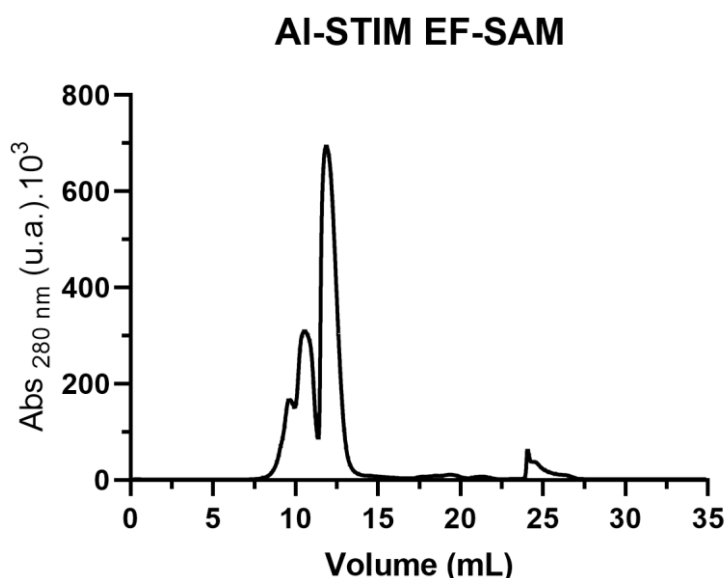


FIGURA 15 : Perfil Cromatográfico da proteína AISTIM EF-SAM. Perfil de eluição obtido através de coluna de exclusão molecular Superdex 75.

Em suma, os resultados obtidos na purificação da proteína AISTIM EF-SAM, uma proteína com elevado grau de pureza, nos permitem investigar a influência do cálcio em sua conformação.

4.5 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) de AISTIM EF-SAM

Utilizamos espectroscopia de CD para investigar a estrutura secundária de AISTIM EF-SAM. Esta é uma proteína que pertence à família EF-hand, que é conhecida por ligar íons de cálcio (Ca^{2+}). O espectro do AISTIM EF-SAM em sua forma APO (sem ligação de Ca^{2+}) revelou dois mínimos intensos em torno de 208 e 225 nm, indicativos de um alto teor de α -hélice, consistentes com os resultados

encontrados por Zheng *et al.* em 2011. Este padrão estrutural foi mantido em uma faixa de temperatura de 20 °C a 50 °C (Figura 16). A partir de 60 °C houve uma mudança significativa no espectro, com perda dos mínimos característicos de hélice e aparecimento de espectro agregados visíveis de proteína.

No entanto, ao contrário do que foi observado por Stathopulos (2006) e colaboradores, o espectro de AISTIM EF-SAM com 5 mM Ca²⁺ também exibiu os dois mínimos intensos característicos de estruturas ricas em α -hélice. Notavelmente, a proteína permaneceu estável em uma faixa de temperatura de 20 °C até 70 °C quando o Ca²⁺ estava presente (Figura 17). Foi reportado por Stathopulos *et al* (2006) uma mudança conformacional considerável entre as formas holo e apo de STIM humana. Na presença de cálcio foram observados os dois mínimos típicos de α -hélice e na ausência de cálcio, o mínimo em 225 nm se tornou menos intenso e foi observado um blueshift no pico de 208 nm, indicando perda na estrutura helicoidal da proteína na forma apo, o que não foi observado para AISTIM EF-SAM (Figura 18).

Estudos mais recentes de Gudlur *et al* (2008), entretanto, mostraram que a perda de estrutura secundária e aparente agregação observada para HsSTIM EF-SAM poderiam ser decorrentes de uma amostra de proteína instável. Neste estudo, Gudlur *et al* fusionaram a porção EF-Sam de STIM à uma proteína estável e que forma uma estrutura do tipo coiled-coil, semelhante à encontrada na STIM, esta proteína de fusão é uma chaperona de *Thermus thermophilus* (GrpE). A construção utilizada, EFSAM-GrpE, não apresentou grande mudança no espectro de CD na ausência de cálcio, apenas uma pequena diminuição na intensidade do sinal, da mesma forma observada em nosso trabalho para AISTIM EF-SAM.

Outro fator importante é que a construção parcial de STIM EF-SAM, utilizada no trabalho de Stathopulos e colaboradores (2006), se mostrou insolúvel quando expressa em bactérias e foi purificada em condições desnaturantes. A construção utilizada por Gudlur *et al.* EFSAM-GrpE e a nossa construção de AISTIM se mostraram solúveis quando expressas em bactéria, indicando que a perda de estrutura observada por Stathopulos *et al* possa ser devido a um artefato de uma construção parcial pouco estável. A nossa construção AISTIM EF-SAM apresentou resposta semelhante à EFSAM-GrpE, mesmo não tendo uma proteína de fusão para estabilizá-la, indicando que a sequência do domínio EF-SAM de *A. lumbricoides* é intrinsecamente mais estável que o mesmo domínio da STIM humana.

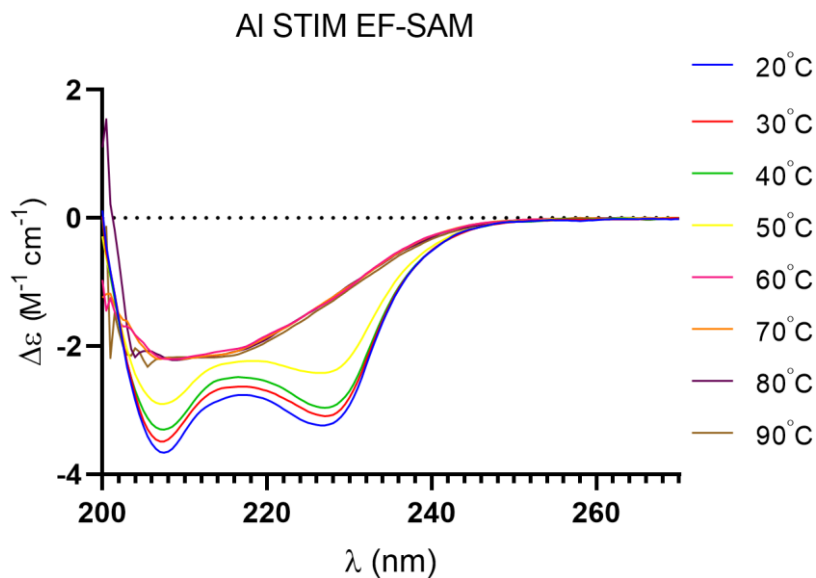


Figura 16: Espectroscopia de Dicroísmo Circular na região far-UV (CD) de STIM EF-SAM A. *lumbricoides* APO. Desnaturação térmica de AISTIM EF-SAM APO (10 μM em tampão A).

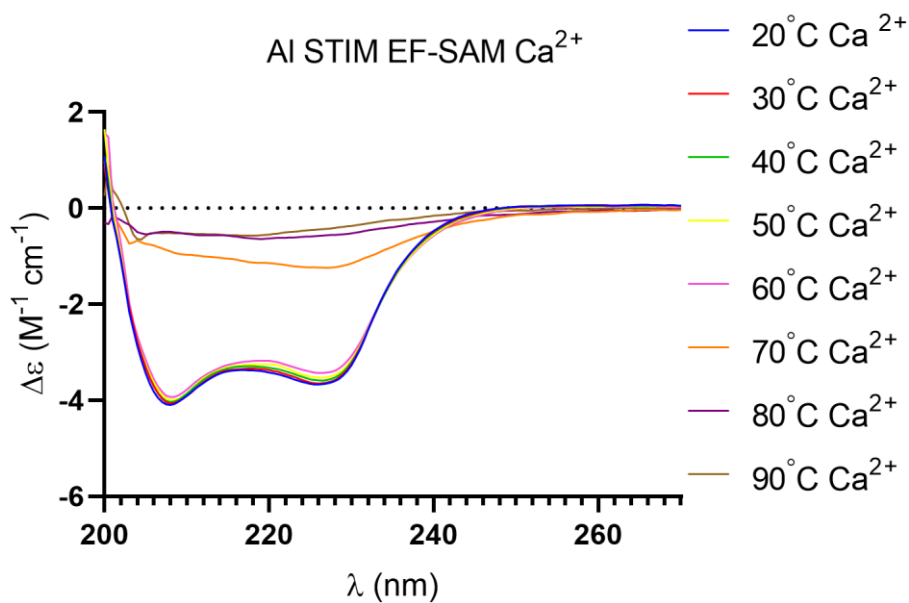


Figura 17: Espectroscopia de Dicroísmo Circular na região far-UV (CD) de AISTIM EF-SAM com 5 mM de Ca^{2+} . Desnaturação térmica monitorada de 20-90 $^{\circ}\text{C}$ de AISTIM EF-SAM a 10 μM em tampão A acrescido de 5 mM de Ca^{2+} .

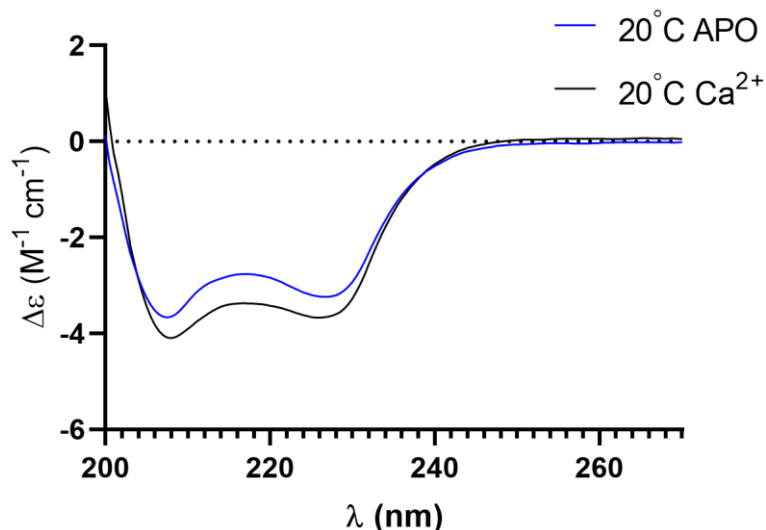


Figura 18: Influência do cálcio na estrutura secundária de AISTIM EF-SAM. Espectroscopia de Dicroísmo Circular na região far-UV (CD) AISTIM EF-SAM (10 μM em tampão A) na forma APO (azul) e com Ca^{2+} (preto) a 20 $^{\circ}\text{C}$.

Avaliamos também a estabilidade térmica de AIEF-SAM foi na presença e ausência de Ca^{2+} pelo monitoramento da elipticidade do CD a 222 nm em função da temperatura (Figura 19).

A desnaturação térmica é um processo no qual a estrutura de uma proteína é desfeita devido ao aumento da temperatura. Isso pode resultar na perda da estrutura secundária, como as α -hélices e folhas- β , e eventualmente na desnaturação completa da proteína, onde ela perde sua estrutura tridimensional nativa.

Os resultados revelam que a proteína AISTIM EF-SAM, na ausência de cálcio, mantém sua estrutura secundária até 50 $^{\circ}\text{C}$, enquanto na presença de cálcio, essa estabilidade é estendida até cerca de 70 $^{\circ}\text{C}$, demonstrando um grande aumento na estabilidade com a adição do ligante. Além disso, a curva sigmoide observada no gráfico da Figura 19 sugere uma transição cooperativa entre as conformações enovelada e desenovelada, com um T_m (temperatura de melting) de cerca de 53 $^{\circ}\text{C}$ para a forma apo e 69 $^{\circ}\text{C}$ para a forma holo. O T_m reportado para HsSTIM EF-SAM na forma apo foi de 19 $^{\circ}\text{C}$ e para a forma holo de 45 $^{\circ}\text{C}$ Stathopoulos *et al* (2006). Desta forma podemos observar que o aumento da estabilidade térmica com a ligação de cálcio é conservado, entretanto uma grande diferença na estabilidade térmica do domínio EF-SAM pode ser observado entre as sequências humanas e de *A. lumbricoides*, sendo esta última consideravelmente mais estável.

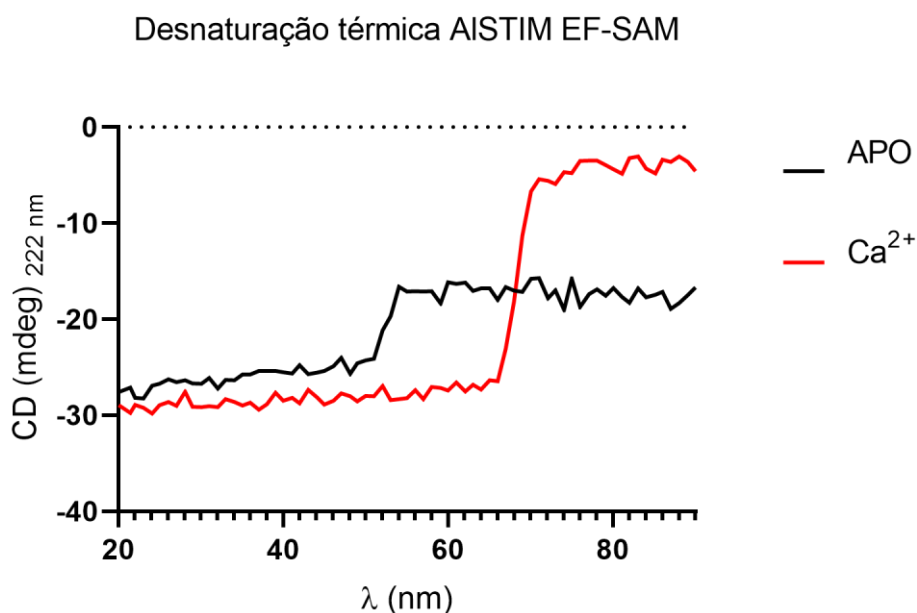


Figura 19: Espectroscopia de Dicroísmo Circular da região Far-UV (CD) STIM EF-SAM *A. lumbricoides*. Desnaturação térmica STIM EF-SAM *A. lumbricoides* APO (preto), STIM EF-SAM *A. lumbricoides* com cálcio (vermelho).

A estabilidade estrutural das proteínas é fundamental para sua função biológica, e a presença de cofatores, como o cálcio, pode desempenhar um papel crucial nesse aspecto. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com achados anteriores, incluindo o trabalho de Gludur e colaboradores (2018), que investigaram a ligação de cálcio pela proteína STIM1. A capacidade da proteína STIM EF-SAM de manter sua estrutura em temperaturas mais elevadas na presença de cálcio sugere que essa interação aumenta a estabilidade estrutural da proteína.

Após a desnaturação térmica, avaliamos se a proteína era capaz de se renovar com a diminuição da temperatura. A renaturação é um processo no qual uma proteína desnaturada, ou seja, com sua estrutura secundária e terciária perturbada, é gradualmente trazida de volta à sua estrutura nativa funcional.

A Figura 20 mostra o espectro de CD da renaturação de AISTIM EF-SAM na forma apo (azul) e holo (vermelha). Os espectros resultantes não possuem os mínimos característicos de hélices e foi observada a presença de agregados na cubeta após a desnaturação térmica, o que torna o processo de renaturação mais difícil. Entretanto, observou-se que a renaturação na presença de cálcio é

ligeiramente maior devido à capacidade do cálcio de estabilizar a estrutura da proteína. Quando o cálcio está presente, ele se liga a sítios específicos na proteína, alterando sua conformação e promovendo a formação de interações favoráveis entre os resíduos aminoacídicos. Essas interações podem incluir ligações iônicas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas que reforçam a estrutura tridimensional da proteína (Zhou et al., 2015).

Além disso, o cálcio pode desempenhar um papel crucial na manutenção da estrutura de domínios específicos, como o EF-hand a esses domínios pode induzir uma mudança conformacional na proteína, favorecendo a renaturação e a recuperação de sua estrutura funcional. Em resumo, a presença de cálcio proporciona um ambiente favorável para a renaturação da proteína, estabilizando sua estrutura e facilitando a restauração de sua atividade biológica.

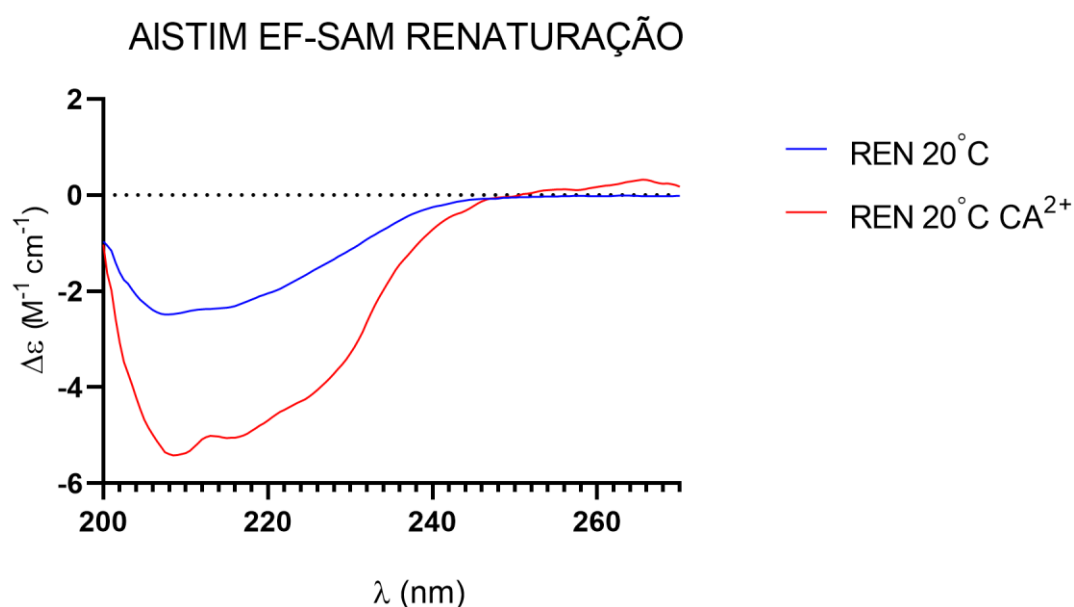


Figura 20: Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) de STIM EF-SAM de *A. lumbricoides* após a desnaturação térmica. Renaturação da proteína STIM EF-SAM *A. lumbricoides* 20 °C sem cálcio (azul) e com cálcio (vermelho).

5. CONCLUSÃO

Em suma, os experimentos com as proteínas purificadas evidenciaram o papel de Orai como formadora de um canal de cálcio e de STIM como sensor de cálcio

intracelular, fornecendo as primeiras informações acerca do canal CRAC do importante nematoide *A. lumbricoide*. A observação das interações e formação de puncta entre HsSTIM e AIOrai por meio da coexpressão de EGFP-HsSTIM e mCherry-AIOrai revelou a importância desta interação na formação e ativação dos canais CRAC, corroborando estudos anteriores em que HsSTIM foi capaz de ativar SmOrai (Orai de *S. mansoni*). Observamos também que a proteína AISTIM EF-SAM exibe uma resposta diferencial à desnaturação térmica na presença e ausência de íons de cálcio. Na ausência de cálcio, a proteína mantém sua estrutura secundária em média até 50°C, enquanto na presença de cálcio, essa estabilidade é estendida até cerca de 70°C, sugerindo uma influência significativa dos íons de cálcio na estabilidade térmica da proteína, como observado para o ortólogo humano. Entretanto, a sequência de AISTIM EF-SAM se mostrou significativamente mais estável que o ortólogo humano e a ausência do Ca^{2+} não influenciou consideravelmente a estrutura da proteína, como reportado anteriormente. Nossos resultados demonstram a eficácia do uso de proteínas recombinantes para estudos celulares e funcionais dos canais CRAC e estabelecem uma base para investigações futuras sobre sua função na regulação da sinalização celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albonico, M., Smith, PG, Hall, A., Chwaya, HM, Alawi, KS, & Savioli, L. (1994). Um ensaio clínico randomizado comparando mebendazol e albendazol contra infecções por *Ascaris*, *Trichuris* e *ancilostoma*. *Transações da Sociedade Real de Medicina Tropical e Higiene* , 88 (5), 585-589.

Almeida, J. K. V. D. (2019). Perfil inflamatório das parasitoses intestinais causadas por helmintos: uma revisão.

Amarante, A. F. T. D., Ragozo, A., & Silva, B. F. D. (2014). Os parasitas de ovinos.

Amcheslavsky, A., Safrina, O., & Cahalan, M. D. (2014). State-dependent block of Orai3 TM1 and TM3 cysteine mutants: insights into 2-APB activation. *Journal of General Physiology*, 143(5), 621-631.

Amcheslavsky, A., Wood, M. L., Yeromin, A. V., Parker, I., Freites, J. A., Tobias, D. J., & Cahalan, M. D. (2015). Molecular biophysics of Orai store-operated Ca²⁺ channels. *Biophysical journal*, 108(2), 237-246.

Andrade A. D. O., De Sá, A. R. N., & Bezagio, R. C. (2017). Prevalência de parasitoses intestinais em crianças de um centro municipal de educação infantil de Campo Mourão, PR/Brasil. *Uningá Review*, 29(3).

Assouline-Thomas, B., Pilotte, A., Petropavlovskaja, M., Makhlin, J., Ding, J., McLeod, D., ... & Rosenberg, L. (2010). Produção e caracterização da proteína recombinante Islet Neogenesis Associated (rINGAP). *Expressão e purificação de proteínas* , 69 (1), 1-8.

Aussel, C., Marhaba, R., Pelasy, C., & Breittmayer, JP (1996). Concentrações submicromolares de La₃₊ bloqueiam o canal ativado pela liberação de cálcio e prejudicam a expressão de CD69 e CD25 em células Jurkat ativadas por CD3 ou taspigargina. *Biochemical Journal* , 313 (3), 909-913.

Ayala Luna, B. M. (2018). Identificación in silico de los canales de Calcio en *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma 11 brucei*".

- Bakowski, D., & Parekh, A. B. (2002). Monovalent cation permeability and Ca²⁺ block of the store-operated Ca²⁺ current I CRAC in rat basophilic leukemia cells. *Pflügers Archiv*, 443, 892-902.
- Barbosa, H. F., Kashiwabara, T. B., & Rocha, L. L. V. (2018). *Parasitologia 1: Helmintos de Interesse Médico*. Appris Editora e Livraria Eireli-ME.
- Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S. M., Loukas, A., Diemert, D., & Hotez, P. J. (2006). Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *The lancet*, 367(9521), 1521-1532.
- Blaxter, M. e Koutsovoulos, G. (2015). A evolução do parasitismo em Nematoda. *Parasitologia*, 142 (S1), S26-S39.
- Bradford, B. R., Whidden, E., Gervasio, E. D., Checchi, P. M., & Raley-Susman, K. M. (2020). Neonicotinoid-containing insecticide disruption of growth, locomotion, and fertility in *Caenorhabditis elegans*. *Plos one*, 15(9), e0238637.
- Braga, F. R., Araújo, J. V., Campos, A. K., Carvalho, R. O., Silva, A. R., Tavela, A. O., & Maciel, A. S. (2007). Observação in vitro da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40, 356-358.
- Brandão, R. C., da Silva, M. R., de Sousa, G. K. L., de Castro, W. M., & Pinto, A. C. M. D. (2019). *Áscaris lumbricoides* e a hipótese higiênica. *Mostra Interdisciplinar do curso de Enfermagem*, 4(1).
- Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Impactos na saúde e no sistema único de saúde decorrentes de agravos relacionados a um saneamento ambiental inadequado.. Brasília: FUNASA, 248 p. 2010.
- Cai, X., Zhou, Y., Nwokonko, R. M., Loktionova, N. A., Wang, X., Xin, P., ... & Gill, D. L. (2016). The Orai1 Store-Operated Calcium Channel Functions as a Hexamer*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(50), 25764-25775.
- Calloway, N., Vig, M., Kinet, J. P., Holowka, D., & Baird, B. (2009). Molecular clustering of STIM1 with Orai1/CRACM1 at the plasma membrane depends

dynamically on depletion of Ca^{2+} stores and on electrostatic interactions. *Molecular biology of the cell*, 20(1), 389-399.

Campos, M. R., Valencia, L. I. O., Fortes, B. D. P. M. D., Braga, R. C. C., & Medronho, R. D. A. (2002). Distribuição espacial da infecção por *Ascaris lumbricoides*. *Revista de Saúde Pública*, 36, 69-74.

Cardona-Arias, JA (2018). Determinantes sociais do parasitismo intestinal, da desnutrição e da anemia: revisão sistemática. *Revista Panamericana de Saúde Pública*, 41, e143.

Cardoso, B. A. (2017). Metodologia de estudo das parasitoses intestinais e da tuberculose em área hiperendêmica em Benevides, Pará (Doctoral dissertation).

Cavallero, S., Snabel, V., Pacella, F., Perrone, V., & D'Amelio, S. (2013). Phylogeographical studies of *Ascaris* spp. based on ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(4), e2170.

Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047-1058.

Clarke, NE, Ng-Nguyen, D., Traub, RJ, Clements, AC, Halton, K., Anderson, RM, ... e Vaz Nery, S. (2019). Um ensaio clínico randomizado controlado comparando a desparasitação escolar e comunitária para o controle de helmintos transmitidos pelo solo em crianças em idade escolar: o protocolo do ensaio CoDe-STH. *Doenças infecciosas BMC*, 19, 1-10.

Concepcion, A. R., Vaeth, M., Wagner, L. E., Eckstein, M., Hecht, L., Yang, J., ... & Feske, S. (2016). Store-operated Ca^{2+} entry regulates Ca^{2+} activated chloride channels and eccrine sweat gland function. *The Journal of clinical investigation*, 126(11), 4303-4318.

Conterno, L. O., Turchi, M. D., Corrêa, I., & de Barros Almeida, R. A. M. (2020). Anthelmintic drugs for treating ascariasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4).

Costa Neto, S. F. D. (2017). *Composição e estrutura das comunidades de helmintos de Didelphis aurita Wied-Neuwied, 1826 (Didelphimorphia, Didelphidae), em três ambientes distintos da Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro* (Doctoral dissertation).

COSTA, D. C., ROCHA, F. C. A. D., & SILVA, A. C. P. D. (2016). Parasitologia.

Covington, E. D., Wu, M. M., & Lewis, R. S. (2010). Essential role for the CRAC activation domain in store-dependent oligomerization of STIM1. *Molecular biology of the cell*, 21(11), 1897-1907.

da Silva Costa, C. D., de Oliveira, K. A., Dias, L. M., dos Santos, P. R., & Nascimento, R. C. F. (2021). Antiparasitário e a vitamina a: sua atuação no combate ao parasitismo por ascaridíase. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, 7(5), 808-828.

da Silva Júnior, C. C., da Azevedo Souza, S., Lopes, M. T., Zacarra, A. A. L., da Sousa Freitas, F. I., da Costa, S. F. G., & Luna, C. M. B. (2016). ENSAIOS CLÍNICOS NO TRATAMENTO DAS GEO-HELMINTÍASES: UMA REVISÃO INTEGRATIVA. *Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*, 12(23), 142.

Da Silva Munareto, D., de Lima, A. P. S., Zardeto-Sabec, G., & Vieira, S. L. V. (2021). Parasitoses em crianças na fase pré-escolar no Brasil: revisão bibliográfica. *Research, Society and Development*, 10(1), e1910111195-e1910111195.

Davis, F. M., Janoshazi, A., Janardhan, K. S., Steinckwich, N., D'Agostin, D. M., Petranka, J. G., ... & Putney Jr, J. W. (2015). Essential role of Orai1 store-operated calcium channels in lactation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5827-5832.

de Andrade Júnior, F. P., Alves, T. W. B., & de Arruda Barbosa, V. S. (2020). Ascaridíase, himenolepiase, amebíase e giardíase: uma atualização. *Educação, Ciência e Saúde*, 7(1).

De Souza, R. R., & Junior, O. M. R. (2021). Anemia ferropriva na infância associada a enteroparasitoses: ancilostomíase e ascaridíase. *Research, Society and Development*, 10(15), e510101523456-e510101523456.

Debaveye, S., Gonzalez Torres, CV, De Smedt, D., Heirman, B., Kavanagh, S., & Dewulf, J. (2018). Os benefícios e encargos para a saúde pública dos programas de administração em massa de medicamentos em crianças vietnamitas: Impacto do mebendazol. *PLOS Doenças Tropicais Negligenciadas*, 12 (11), e0006954.

Derler, I., Jardin, I., Stathopoulos, P. B., Muik, M., Fahrner, M., Zayats, V., ... & Romanin, C. (2016). Cholesterol modulates Orai1 channel function. *Science signaling*, 9(412), ra10-ra10.

Derler, I., Plenk, P., Fahrner, M., Muik, M., Jardin, I., Schindl, R., ... & Romanin, C. (2013). The Extended Transmembrane Orai1 N-Terminal (ETON) Region Combines Binding Interface and Gate for Orai1 Activation by STIM1*♦. *Journal of Biological Chemistry*, 288(40), 29025-29034.

Diretrizes: Quimioterapia preventiva para o controle de infecções por helmintos transmitidos pelo contato com o solo em grupos de risco. Washington, D.C.: Organização Pan-Americana da Saúde; 2018. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Du, Z., Fei, T., Verhaak, R. G., Su, Z., Zhang, Y., Brown, M., ... & Liu, X. S. (2013).

Evangelista, C. M., Soares, C. W., de Araújo, R. P., Molinari, P. V., Reinert, B., Soares, S. L., ... & Pedras, F. D. (2020). Aspectos clínicos e cirúrgicos do parasitismo por *Diocotophyma renale* em cão. *Pubvet*, 14, 148.

Falcone, S., Romani, M., Banchetti, M., & Macri, S. (2018). Store-operated Ca²⁺ entry and STIM/Orai: role and therapeutic potential for non-excitabile cells. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3503.

Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., ... & Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), 179-185.

Fonseca, E. O. L., Teixeira, M. G., Barreto, M. L., Carmo, E. H., & Costa, M. D. C. N. (2010). Prevalência e fatores associados às geo-helmintíases em crianças residentes em municípios com baixo IDH no Norte e Nordeste brasileiros. *Cadernos de Saúde Pública*, 26, 143-152.

Fowler, AC, & Déirdre Hollingsworth, T. (2016). A dinâmica das infecções por *Ascaris lumbricoides*. *Boletim de biologia matemática*, 78, 815-833.

FRANCO, L. D. C. F., ARAÚJO, L. F. D. A., PEIXOTO, L. C. M., & ALVES, L. F. (2022). Infecção por *Ascaris lumbricoides*: Impactos no desenvolvimento infantil. *Doenças Infecciosas Parasitárias*, 53.

Frei, F., Juncansen, C., & Ribeiro-Paes, J. T. (2008). Levantamento epidemiológico das parasitoses intestinais: viés analítico decorrente do tratamento profilático. *Cadernos de saúde pública*, 24(12), 2919-2925.

Furtado, L. F. V. (2014). Desenvolvimento e aplicação de uma metodologia para varredura de polimorfismo relacionado à resistência aos Benzimidazóis em *Ancylostoma caninum*.

Gao, S., Fan, Y., Chen, L., Lu, J., Xu, T., & Xu, P. (2009). Mechanism of different spatial distributions of *Caenorhabditis elegans* and human STIM1 at resting state. *Cell calcium*, 45(1), 77-88.

Geraert, E. (2019). *Os Dolichodoridae do mundo: identificação da família Dolichodoridae (Nematoda: Tylenchida)*. Imprensa Academia.

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison III, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, 6(5), 343-345.

Gross, A. A., & da Silva, G. K. (2016). Incidência de enteroparasitos intestinais em uma escola infantil pública e uma escola infantil comunitária, em um município no interior do Rio Grande do Sul. *Revista Destaques Acadêmicos*, 8(3).

Gudlur, A., & Hogan, P. G. (2017). The STIM-Orai pathway: Orai, the pore-forming subunit of the CRAC channel. *Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) Pathways: Emerging Signaling Concepts in Human (Patho) physiology*, 39-57.

Gudlur, A., Zeraik, A. E., Hirve, N., Rajanikanth, V., Bobkov, A. A., Ma, G., ... & Hogan, P. G. (2018). Calcium sensing by the STIM1 ER-luminal domain. *Nature communications*, 9(1), 4536.

Gudlur, A., Zhou, Y., & Hogan, P. G. (2013). STIM–ORAI interactions that control the CRAC channel. *Current topics in membranes*, 71, 33-58.

Guerrero-Hernández, A., Sánchez-Vázquez, V. H., Martínez-Martínez, E., Sandoval-Vázquez, L., Perez-Rosas, N. C., Lopez-Farias, R., & Dagnino-Acosta, A. (2020). Sarco-endoplasmic reticulum calcium release model based on changes in the luminal calcium content. *Calcium Signaling*, 337-370.

Hogan, P. G., & Rao, A. (2015). Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochemical and biophysical research communications*, 460(1), 40-49.

Hogan, P. G., Lewis, R. S., & Rao, A. (2009). Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and Orai. *Annual review of immunology*, 28, 491-533.

Hoth, M. & Penner, R. (1993). Corrente de cálcio ativada por liberação de cálcio em mastócitos de ratos. *The Journal of physiology*, 465 (1), 359-386.

Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M., & Long, S. B. (2012). Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science*, 338(6112), 1308-1313.

Johnston, E. A., Teague, J., & Graham, J. P. (2015). Challenges and opportunities associated with neglected tropical disease and water, sanitation and hygiene intersectoral integration programs. *BMC Public Health*, 15(1), 1-14.

Jourdan, PM, Lamberton, PH, Fenwick, A., & Addiss, DG (2018). Infecções por helmintos transmitidos pelo solo. *The Lancet*, 391 (10117), 252-265.

Kaji, H., Tsuji, T., Mawuenyega, K. G., Wakamiya, A., Taoka, M., & Isobe, T. (2000). Profiling of *Caenorhabditis elegans* proteins using two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 21(9), 1755-1765.

Kar, P., & Parekh, A. B. (2015). Distinct spatial Ca²⁺ signatures selectively activate different NFAT transcription factor isoforms. *Molecular cell*, 58(2), 232-243.

Katz, N. (2018). Inquérito Nacional de Prevalência da *Esquistossomose mansoni* e Geo-helmintoses.

Keizer, K., Lindenberg, S. e Steg, L. (2008). A propagação da desordem *ciência*, 322 (5908), 1681-1685.

Kim, K. M., Wijerathne, T., Hur, J. H., Kang, U. J., Kim, I. H., Kweon, Y. C., ... & Park, C. Y. (2018). Distinct gating mechanism of SOC channel involving STIM–Orai coupling and an intramolecular interaction of Orai in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(20), E4623-E4632..

Krücken, J., Fraundorfer, K., Mugisha, J. C., Ramünke, S., Sifft, K. C., Geus, D., ... & von Samson-Himmelstjerna, G. (2017). Reduced efficacy of albendazole against

Ascaris lumbricoides in Rwandan schoolchildren. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 7(3), 262-271.

Lacruz, R. S., & Feske, S. (2015). Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1356(1), 45-79.

Lagatie, O., Verheyen, A., Van Hoof, K., Lauwers, D., Odier, M. R., Vlamincx, J., ... & Stuyver, L. J. (2020). Detection of *Ascaris lumbricoides* infection by ABA-1 coproantigen ELISA. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(10), e0008807.

Lamberton, PH e Jourdan, PM (2015). Ascariíase humana: atualização diagnóstica. *Relatórios atuais de medicina tropical*, 2, 189-200.

Legesse M, Erko B, Medhin G. Comparative efficacy of albendazole and three brands of mebendazole in the treatment of *ascariasis* and *trichuriasis*. *East Afr Med J*. 2004 Mar;81(3):134-8. doi: 10.4314/eamj.v81i3.9142. PMID: 15293971.

Lewis, R. S., & Cahalan, M. D. (1989). Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca^{2+} and transmembrane Ca^{2+} current in human leukemic T cells. *Cell regulation*, 1(1), 99-112.

Li, Z., Lu, J., Xu, P., Xie, X., Chen, L., & Xu, T. (2007). Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(40), 29448-29456.

Lima, F. D. S. (2017). Uma proposta de intervenção para prevenção de parasitoses em crianças escolares na Estratégia Saúde da Família.

Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T., & Meyer, T. (2007). Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca^{2+} store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(22), 9301-9306.

Liou, J., Kim, M. L., Do Heo, W., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., & Meyer, T. (2005). STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Current biology*, 15(13), 1235-1241.

Lorin-Nebel, C., Xing, J., Yan, X., & Strange, K. (2007). CRAC channel activity in *C. elegans* is mediated by Orai1 and STIM1 homologues and is essential for ovulation and fertility. *The Journal of physiology*, 580(1), 67-85.

Luik, R. M., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M. M., & Lewis, R. S. (2008). Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature*, *454*(7203), 538-542.

Luik, R. M., Wu, M. M., Buchanan, J., & Lewis, R. S. (2006). The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *The Journal of cell biology*, *174*(6), 815-825.

Ma, G., Wei, M., He, L., Liu, C., Wu, B., Zhang, S. L., ... & Zhou, Y. (2015). Inside-out Ca²⁺ signalling prompted by STIM1 conformational switch. *Nature communications*, *6*(1), 1-14.

Maia, C. V. A., Hassum, I. C., & Valladares, G. S. (2015). Parasitoses intestinais em usuários do sus em Limoeiro do Norte, Ceará, antes de expansão de sistema de esgotamento sanitário. *Holos*, *2*, 98-109.

Martínez-Martínez, E., Sánchez-Vázquez, VH, León-Aparicio, D., Sanchez-Collado, J., Gallegos-Gómez, ML, Rosado, JA, ... & Guerrero-Hernández, A. (2022) . A fosforilação do canal Orai1 mediada por PKC modula a sinalização de Ca²⁺ em células HeLa. *Cells* , *11* (13), 2037.

McMahon, C., McCoy, M., Ellison, S. E., Barley, J. P., Edgar, H. W. J., Hanna, R. E. B., ... & Fairweather, I. (2013). Anthelmintic resistance in Northern Ireland (III): Uptake of 'SCOPS'(Sustainable Control of Parasites in Sheep) recommendations by sheep farmers. *Veterinary parasitology*, *193*(1-3), 179-184.

McNally, B. A., Somasundaram, A., Jairaman, A., Yamashita, M., & Prakriya, M. (2013). The C-and N-terminal STIM1 binding sites on Orai1 are required for both trapping and gating CRAC channels. *The Journal of physiology*, *591*(11), 2833-2850.

Melo, E. M., Ferraz, F. N., & Aleixo, D. L. (2010). Importância do estudo da prevalência de parasitos intestinais de crianças em idade escolar. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, *5*(1).

Melo, M.C.B. et al. Parasitoses intestinais. *Rev Med* 2004; *14*:3-12.

Ministério Da Saúde. Guia Prático para o Controle das Geo-helmintíases. Brasília/DF, 2018.

Mirfazaelian, A., Rouini, MR, & Dadashzadeh, S. (2002). Farmacocinética dependente da dose do albendazol em humanos. *Biofarmacêutica e disposição de medicamentos*, 23 (9), 379-383.

Monteiro, M. D., Ferreira, N. F., Marins, F. R., & de Assis, I. B. (2019). Anemia megaloblástica: revisão de literatura. *Revista Saúde em Foco. Ed*, (11), 934-963.

Moraes, G. F. Q., Castro, F. M. A., & Teixeira, A. P. C. (2020). Infecções pulmonares relacionadas com parasitos humanos. *Journal of Medicine and Health Promotion*, 5(3), 43-56.

Moravec, F. (1998). *Hysterothylacium nipponense* nom. n.(Nematoda: Anisakidae) para *H. japonicum* Moravec et Nagasawa, 1998 preocupado por *Hysterothylacium japonicum* Rajyalakshmi, 1996. *Folia parasitologica*, 45 (328).

Mota, D., Fernandes, F., & Avelino, P. (2022). Enteroparasitoses intestinais na infância e seu impacto no desenvolvimento infantil.

Muik, M., Fahrner, M., Derler, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., ... & Romanin, C. (2009). A cytosolic homomerization and a modulatory domain within STIM1 C terminus determine coupling to ORAI1 channels. *Journal of biological chemistry*, 284(13), 8421-8426.

Muik, M., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Bergsmann, J., Eder, P., ... & Romanin, C. (2008). Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 8014-8022.

Navarro-Borelly, L., Somasundaram, A., Yamashita, M., Ren, D., Miller, R. J., & Prakriya, M. (2008). STIM1–Orai1 interactions and Orai1 conformational changes revealed by live-cell FRET microscopy. *The Journal of physiology*, 586(22), 5383-5401.

Nawaratna, S. S., You, H., Jones, M. K., McManus, D. P., & Gobert, G. N. (2018). Calcium and Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase II as targets for helminth parasite control. *Biochemical Society Transactions*, 46(6), 1743-1751.

Neves, D. P. Relação Parasito-Hospedeiro. In: *Parasitologia Humana*. 13. ed. São Paulo: Atheneu, p. 6 – 25. 2016.

Newton, A. C., Bootman, M. D., & Scott, J. D. (2016). Second messengers. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(8), a005926.

Organização Mundial da Saúde (2019). *Water, sanitation, hygiene and health: a primer for health professionals* (No. WHO/CED/PHE/WSH/19.149). World Health Organization.

Organização Mundial da Saúde (OMS) Genebra: OMS; 2017. Diretriz: quimioterapia preventiva para controlar infecções por helmintos transmitidos pelo solo em grupos populacionais de risco.

Palty, R., & Isacoff, E. Y. (2016). Cooperative binding of stromal interaction molecule 1 (STIM1) to the N and C termini of calcium release-activated calcium modulator 1 (Orai1). *Journal of Biological Chemistry*, 291(1), 334-341.

Pan, X., Liu, J., Nistala, H., Lee, K. G., Jin, H., Ghiran, I., ... & Tsai, B. (2018). Imaging STIM1 dynamics and ORAI1 interaction in CRAC channel activation. *The Journal of cell biology*, 217(5), 1683-1697.

Parekh, AB, & Putney Jr, JW (2005). Canais de cálcio operados por armazenamento. *Physiological reviews*, 85 (2), 757-810.

Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., ... & Lewis, R. S. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*, 136(5), 876-890.

Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., ... & Lewis, R. S. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*, 136(5), 876-890.

Patriarcha, A. P. (2012). Parasitismo por *Ascaris lumbricoides*: abordagem teórica.

Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D. L., Beck, A., Nadler, M. J., Koblan-Huberson, M., ... & Kinet, J. P. (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nature cell biology*, 8(7), 771-773.

Pereira, M.S., Morais, R.C.S. Desnutrição Infantil Associada às Parasitoses Intestinais em Crianças na Fase Escolar: Um levantamento acadêmico. Pernambuco, 2020.

Pereira, P. D., do Carmo Sperandio, N., Cassani, L. S., de Almeida, A. F. M., & Martins, I. V. F. (2022). O papel da educação na prevenção das parasitoses intestinais humanas. *TÓPICOS ESPECIAIS EM CIÊNCIA ANIMAL XI*, 46.

Prakriya, M. (2009). The molecular physiology of CRAC channels. *Immunological reviews*, 231(1), 88-98.

Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2001). Potentiation and inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP₃ receptors. *The Journal of physiology*, 536(Pt 1), 3.

Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2006). Regulation of CRAC channel activity by recruitment of silent channels to a high open-probability gating mode. *The Journal of general physiology*, 128(3), 373-386.

Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2015). Store-operated calcium channels. *Physiological reviews*.

Prichard, R. (2007). Marcadores de resistência ao benzimidazol em nematóides parasitas humanos? *Parasitologia*, 134 (8), 1087-1092. doi:10.1017/S003118200700008X

Prole, D. L., & Taylor, C. W. (2011). Identification of intracellular and plasma membrane calcium channel homologues in pathogenic parasites. *PloS one*, 6(10), e26218.

Providelo, G. A. (2019). Contaminação ambiental por geo-helminthos em praças do município de Botucatu, São Paulo.

Robertson, AP, Clark, CL e Martin, RJ (2010). Receptores de levamisol e rianodina (I): Um estudo de contração em *Ascaris suum*. *Parasitologia molecular e bioquímica*, 171 (1), 1-7.

Roos, J., DiGregorio, PJ, Yeromin, AV, Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., ... & Stauderman, KA (2005). STIM1, um componente essencial e conservado da função do canal de Ca²⁺ operado por armazenamento. *The Journal of Cell Biology*, 169 (3), 435-445.

Ross, P. E., & Cahalan, M. D. (1995). Ca^{2+} influx pathways mediated by swelling or stores depletion in mouse thymocytes. *The Journal of general physiology*, 106(3), 415-444.

Sánchez-Vázquez, VH, Martínez-Martínez, E., Gallegos-Gómez, ML, Arias, JM, Pallafacchina, G., Rizzuto, R., & Guerrero-Hernández, A. (2023). A heterogeneidade do armazenamento de Ca^{2+} do retículo endoplasmático determina a colocalização com mitocôndrias. *Cálcio Celular*, 109, 102688.

Shalygin, AV, Kolesnikov, D., Skopin, A., Perevoznikova, A., Glushankova, L., & Kaznacheyeva, EV (2018). O nível de expressão das proteínas STIM altera as propriedades eletrofisiológicas dos canais de cálcio endógenos. *Revista Biofísica*, 114 (3), 286a.

Silva, E. D. S., Oliveira, D. D. D., & Lopes, A. P. (2020). Acesso ao Saneamento básico e Incidência de Cólera: uma análise quantitativa entre 2010 e 2015. *Saúde em debate*, 43, 121-136.

Silva, E. M. B. (2022). Helmintíases transmitidas pelo solo e condições sanitárias em bairros de Anápolis–GO.

Silva, E. P., Silva, J. M., Nascimento, M. C., Aoyama, E. A., Rabelo, L. M., Alexandre, K. V., & de Moura Rodrigues, G. M. (2019). *Ascaris lumbricoides*, quais os danos causados por essa enfermidade nas crianças?. *Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde*, 6(11), 19-24.

Simões, B. D. S., Machado-Coelho, G. L. L., Pena, J. L., & Freitas, S. N. D. (2015). Condições ambientais e prevalência de infecção parasitária em indígenas Xukuru-Kariri, Caldas, Brasil. *Revista Panamericana de Salud Publica*, 38(1), 42-48.

Siqueira, R. L. L. D. S., & Tristão, T. C. (2019). Ocorrência e geolocalização de parasitos intestinais em laudos parasitológicos de fezes de crianças em um laboratório privado do município de Alto Paraiso/RO nos anos de 2017-2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) - Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA, 2019.

Soares, A. L., de Oliveira Neves, E. A., & de Souza, I. F. A. C. (2018). A importância da educação sanitária no controle e prevenção ao *Ascaris lumbricoides* na

infância. *Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-Pernambuco*, 3(3), 22-22.

Soares, I. A., Zotti, A. P., Gnoatto, E. S., Pletsch, F., & Brock, G. M. C. (2020). Parasitoses intestinais em crianças de centros municipais de educação infantil. *Varia Scientia-Ciências da Saúde*, 6(1), 9-17.

Soboloff, J., Rothberg, BS, Madesh, M., & Gill, DL (2012). Proteínas STIM: transdutores dinâmicos de sinal de cálcio. *Nature reviews Biologia celular molecular*, 13 (9), 549-565.

Soboloff, J., Spassova, M. A., Tang, X. D., Hewavitharana, T., Xu, W., & Gill, D. L. (2006). Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 20661-20665.

Stathopoulos, P. B., Li, G. Y., Plevin, M. J., Ames, J. B., & Ikura, M. (2006). Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 35855-35862.

Stathopoulos, P. B., & Ikura, M. (2017). Store operated calcium entry: From concept to structural mechanisms. *Cell Calcium*, 63, 3-7.

Strange, K., Yan, X., Lorin-Nebel, C., & Xing, J. (2007). Physiological roles of STIM1 and Orai1 homologs and CRAC channels in the genetic model organism *Caenorhabditis elegans*. *Cell calcium*, 42(2), 193-203.

Taylor-Robinson, DC, Donegan, S., Chaplin, M., & Garner, P. (2019). Programas de desparasitação de saúde pública para helmintos transmitidos pelo solo em crianças que vivem em áreas endêmicas. *Banco de Dados Cochrane de Revisões Sistemáticas*, (9).

Teixeira, A. G. S., Santos, F. B., Santos, G. R., de Sousa Santos, M. D. R., & Rodrigues, G. M. (2019). Os efeitos do saneamento básico precário para o aumento da ascaris lumbricoides. *Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde*, 5(10), 34-40.

Utzinger, J., & Keiser, J. (2004). Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 5(2), 263-285.

Vercruysse, J., Behnke, JM, Albonico, M., Ame, SM, Angebault, C., Bethony, JM, ... & Levecke, B. (2011). Avaliação da eficácia anti-helmíntica do albendazol em crianças em idade escolar em sete países onde os helmintos transmitidos pelo solo são endêmicos. *PLoS doenças tropicais negligenciadas* , 5 (3), e948.

Verma, S., Robertson, AP e Martin, RJ (2007). O neuropeptídeo nematóide, AF2 (KHEYLRF-NH₂), aumenta as correntes de cálcio ativadas por voltagem no músculo *Ascaris suum*. *Jornal britânico de farmacologia* , 151 (6), 888-899.

Vicente, J. J., & Pinto, R. M. (1999). Nematóides do Brasil: nematóides de peixes atualização: 1985-1998. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16, 561-610.

Vig, M., Beck, A., Billingsley, J. M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., ... & Penner, R. (2006). CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Current Biology*, 16(20), 2073-2079.

Walter, P. e Ron, D. (2011). A resposta proteica desdobrada: da via do estresse à regulação homeostática. *ciência* , 334 (6059), 1081-1086.

Wang, Y., Deng, X., Zhou, Y., Hendron, E., Mancarella, S., Ritchie, M. F., ... & Gill, D. L. (2009). STIM protein coupling in the activation of Orai channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(18), 7391-7396.

Wang, W., Li, Y., Wang, Y., Shi, C., Li, C., Li, Q., & Linhardt, R. J. (2018). Bacteriophage T7 transcription system: an enabling tool in synthetic biology. *Biotechnology advances*, 36(8), 2129-2137.

Wang, J., & Davis, R. E. (2020). *Ascaris*. *Current Biology*, 30(10), R423-R425.

Williams, P. D., Kashyap, S. S., McHugh, M. A., Brewer, M. T., Robertson, A. P., & Martin, R. J. (2022). Diethylcarbamazine, TRP channels and Ca²⁺ signaling in cells of the *Ascaris* intestine. *Scientific Reports*, 12(1), 21317.

Xu, P., Lu, J., Li, Z., Yu, X., Chen, L., & Xu, T. (2006). Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orai1. *Biochemical and biophysical research communications*, 350(4), 969-976.

Yang, S., Zhang, J. J., & Huang, X. Y. (2012). Oligomerization of STIM1 couples store depletion to Orai1 activation. *Nature chemical biology*, 8(11), 987-994.

Yen, M., Lokteva, L. A., & Lewis, R. S. (2016). Functional analysis of Orai1 concatemers supports a hexameric stoichiometry for the CRAC channel. *Biophysical Journal*, 111(9), 1897-1907.

Yen, M., & Lewis, R. S. (2019). Numbers count: How STIM and Orai stoichiometry affect store-operated calcium entry. *Cell Calcium*, 79, 35-43.

Yilmaz, E. (2019). *Metabolismo de lactonas macrocíclicas e benzimidazóis em nematóides parasitas* (dissertação de doutorado).

Yuan, J. P., Zeng, W., Dorwart, M. R., Choi, Y. J., Worley, P. F., & Muallem, S. (2009). SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nature cell biology*, 11(3), 337-343.

Zardeto-Sabec, Giuliana, Vanazzi Marcon, Adriana, da Silva Quemel, Franciele, Gafuri Teixeira, Debora, & Almeida de Jesus, Renan (2020). Análise dos laudos do exame parasitológico de fezes de um laboratório da cidade de Umuarama-PR no ano de 2018. *Brazilian Journal of Surgery & Clinical Research*, 30(3).

Zeibig, E. (2014). *Parasitologia Clínica: Uma abordagem clínico-laboratorial*. Elsevier Brasil.

Zeraik, AE, Fontes, MG, Lopes, JLS, Araújo, APUD, & De Marco, R. (2016). A interação STIM-Orai no *Schistosoma Mansoni* indica a existência de entrada funcional de cálcio operada por armazenamento no parasita. *Revista Biofísica*, 110 (3), 264a.

Zeraik, AE, Gudlur, A., DeMarco, R., Araujo, APU, & Hogan, P. (2018). Caracterização do Canal de Cálcio Ativado por Liberação de Cálcio (CRAC) do Patógeno Humano *Schistosoma mansoni*. *Biophysical Journal*, 114 (3), 286a.

Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Zhang, X. H. F., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., ... & Cahalan, M. D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca²⁺ influx identifies genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9357-9362.

Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., ... & Cahalan, M. D. (2005). STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature*, 437(7060), 902-905.

Zhang, X., Li, Q., Zhu, A., Liang, W., Zhang, J. e Steinberger, Y. (2012). Efeitos do preparo do solo e do manejo de resíduos nas comunidades de nematóides do solo no norte da China. *Indicadores Ecológicos*, 13 (1), 75-81.

Zheng, H., Zhou, M. H., Hu, C., Kuo, E., Peng, X., Hu, J., ... & Zhang, S. L. (2013). Differential roles of the C and N termini of Orai1 protein in interacting with stromal interaction molecule 1 (STIM1) for Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channel activation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(16), 11263-11272.

Zheng, L., Stathopoulos, P. B., Schindl, R., Li, G. Y., Romanin, C., & Ikura, M. (2011). Auto-inhibitory role of the EF-SAM domain of STIM proteins in store-operated calcium entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(4), 1337-1342.

Zhou, Y., Srinivasan, P., Razavi, S., Seymour, S., Meraner, P., Gudlur, A., ... & Hogan, P. G. (2013). Initial activation of STIM1, the regulator of store-operated calcium entry. *Nature structural & molecular biology*, 20(8), 973-981.

Lewis, R. S., & Cahalan, M. D. (1989). Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells. *Cell regulation*, 1(1), 99-112.