

EXPLORANDO A PROTEÍNA SmE16 DE *Schistosoma mansoni*: UM  
ESTUDO BIOFÍSICO DE SUAS FUNÇÕES E INTERAÇÕES.

**THAIS RANGEL FIGUEIREDO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO-  
UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

FEVEREIRO DE 2026

EXPLORANDO A PROTEÍNA SmE16 DE *Schistosoma mansoni*: UM ESTUDO  
BIOFÍSICO DE DE SUAS FUNÇÕES E INTERAÇÕES.

**THAIS RANGEL FIGUEIREDO**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Eliza Zeraik

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO de 2026

### FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

F475

Figueiredo, Thais Rangel.

"EXPLORANDO A PROTEÍNA SmE16 DE *Schistosoma mansoni* : UM ESTUDO BIOFÍSICO DE DE SUAS FUNÇÕES E INTERAÇÕES". / Thais Rangel Figueiredo. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

78 f. : il.

Bibliografia: 67 - 73.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2026.

Orientadora: Ana Eliza Zeraik.

1. Caracterização biofísica. 2. EF-hand. 3. Sensores de cálcio. 4. 16 kDa calcium-binding protein. 5. Esquistossomose. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570


EXPLORANDO A PROTEÍNA SmE16 DE *Schistosoma mansoni*: UM ESTUDO  
BIOFÍSICO DE DE SUAS FUNÇÕES E INTERAÇÕES.

**THAIS RANGEL FIGUEIREDO**

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

Aprovada em 10 de fevereiro de 2026

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 **ARNOLDO ROCHA FACANHA**  
Data: 12/02/2026 16:13:00-03:00  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof. Arnaldo Rocha Façanha (Doutor em Química Biológica) - UENF

Documento assinado digitalmente  
 **JORGE HERNANDEZ FERNANDEZ**  
Data: 12/02/2026 13:15:30-03:00  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof. Jorge Hernandez Fernandez (Doutor em Biologia Molecular e Morfofuncional) -  
UENF

Documento assinado digitalmente  
 **JOSE LUIZ DE SOUZA LOPES**  
Data: 11/02/2026 10:42:58-03:00  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. José Luiz de Souza Lopes (Doutor em Física Aplicada: Biomolecular) - USP

Documento assinado digitalmente  
 **ANA ELIZA ZERAİK**  
Data: 11/02/2026 10:38:23-03:00  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof<sup>ª</sup>. Ana Eliza Zeraik (Doutora em Física Aplicada: Biomolecular) - UENF  
(Orientadora)

Aos meus pais, irmãos,  
amigos e mestres, com  
carinho dedico

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço pela fé que me trouxe esperança, coragem, perseverança me fortalecendo nos momentos difíceis que me conduziu até aqui.

Aos meus pais, Margarete Rangel e José Nilton Figueiredo, pelo amor e apoio incondicional, e por acreditarem em mim mesmo diante das dificuldades e obstáculos impostos pela vida.

Aos meus irmãos, Larissa Figueiredo e Lucas Figueiredo, pelo amor, carinho, incentivo, paciência, e motivação sendo uma das minhas maiores motivações para continuar estudando em busca de um futuro melhor.

Ao meu amor, Alef Silva, que trilhou esse caminho ao meu lado me incentivando e acreditando em mim mesmo nos momentos em que eu não acreditava. Obrigada por me fortalecer, me acalmar e tornar essa caminhada mais leve e especial.

Agradeço a todos pelo amor, incentivo e compreensão nos momentos de ausência e cansaço. Sem esse apoio, nada disso seria possível.

Agradeço à minha mestra Profa. Ana Eliza Zeraik por ter acreditado em mim desde o primeiro contato, no ano de 2021, quando iniciei minha jornada na vida científica. Obrigada por todo apoio, incentivo, por confiar seu tempo, conhecimento e dedicação ao meu trabalho. Obrigada pela excelência na função como orientadora, me guiando desde o início através do mundo científico.

Aos colegas do grupo de bioquímica e biofísica molecular da UENF, agradeço pelo apoio, pelas discussões científicas e pela convivência diária, que tornaram essa caminhada mais leve e enriquecedora.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, processos E-26/200.177/2023, E-26/210.094/2022, E-26/211.860/2021), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código Financeiro 001 pelo financiamento desta pesquisa. Esta pesquisa foi também realizada com o uso de infraestrutura financiada pela Finep, no âmbito do programa FINEP/MCTI/FNDCT/PROINFRA 2021 (Convênio nº 0.1.22.0442.00).

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência e Biotecnologia (PGBB) pela infraestrutura e oportunidade de formação.

Agradeço a Dra. Francianne Galossi pela gentileza em atuar como revisora desta dissertação.

Aos membros da banca examinadora agradeço pela disponibilidade, atenção e as valiosas contribuições que serão oferecidas durante a avaliação deste trabalho.

“Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido. Agora é hora de compreender mais, para temer menos.”

**Marie Curie**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 Doenças tropicais negligenciadas: desafios e perspectivas.....	19
1.2 Esquistossomose.....	20
1.2.2 Capacidade do Schistosoma em modular a resposta imune do hospedeiro...	26
1.2.3 Tratamento contra esquistossomose.....	27
1.2 Proteínas ligantes a cálcio.....	28
1.2.1 Família EF-hand.....	29
1.3 Proteína SmE16.....	30
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	33
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>33</b>
3.1 Análise comparativa das sequências proteicas da SmE16 e proteínas da família EF-hand em helmintos.....	33
3.9 Análises por espectrometria de massas GeLC-MS/MS.....	42
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1 Análise de bioinformática das sequências de aminoácidos da proteína SmE16 e proteínas EF-hand.....	43
4.5 Avaliação de mudanças conformacionais por eletroforese de poliacrilamida nativa e por digestão branda com tripsina.....	49
4.7 Avaliação da estabilidade térmica da proteína através de ensaios de DSC.....	51
4.8 Identificação de potenciais parceiros proteicos entre a proteínas SmE16 e proteínas do hospedeiro vertebrado.....	53
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>

<b>APÊNDICE A</b> – Análises proteômicas do soro murino.....	<b>74</b>
<b>APÊNDICE B</b> – Análises proteômicas do soro de humano.....	<b>75</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros termodinâmicos associados à desnaturação térmica da proteína SmE16.....	<b>53</b>
<b>Tabela 2.</b> Proteínas identificadas nas diferentes condições experimentais do soro murino após filtragem e agrupamento.....	<b>58</b>
<b>Tabela 3.</b> Proteínas identificadas nas diferentes condições experimentais do soro humano após filtragem e agrupamento.....	<b>59</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mapa demonstrando a persistência global da esquistossomose e necessidade contínua de quimioterapia no ano de 2024.....	<b>22</b>
<b>Figura 2:</b> Expansão histórica da área endêmica da esquistossomose no Brasil, desde o foco inicial até a consolidação das áreas atuais de transmissão.....	<b>23</b>
<b>Figura 3:</b> Distribuição da esquistossomose e de seus hospedeiros intermediários no Brasil.....	<b>24</b>
<b>Figura 4:</b> Esquema demonstrando o ciclo de vida de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	<b>26</b>
<b>Figura 5:</b> Representação do motivo EF-hand, responsável pela ligação ao cálcio...30	
<b>Figura 6:</b> Níveis de expressão da proteína SmE16 em diferentes estágios de desenvolvimento e tecidos de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	<b>31</b>
<b>Figura 7:</b> Predição estrutural da proteína SmE16.....	<b>32</b>
<b>Figura 8:</b> Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos da proteína SmE16 e das calmodulinas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	<b>44</b>
<b>Figura 9:</b> Expressão e purificação da proteína SmE16.....	<b>45</b>
<b>Figura 10:</b> Isoterma da interação entre a proteína SmE16 e íons de $Ca^{2+}$ .....	<b>47</b>
<b>Figura 11:</b> Isoterma da interação entre a proteína SmE16 e íons de $Mg^{2+}$ .....	<b>48</b>
<b>Figura 12:</b> Espectros de dicroísmo circular (CD) da proteína SmE16 na ausência e presença de $Ca^{2+}$ .....	<b>49</b>
<b>Figura 13:</b> Alterações conformacionais da proteína SmE16 (40 $\mu$ M) induzidas pela ligação de cálcio.....	<b>50</b>
<b>Figura 14:</b> Dimerização parcial de SmE16 (40 $\mu$ M) induzida por cálcio.....	<b>51</b>
<b>Figura 15:</b> Perfil calorimétrico da proteína SmE16 e $Ca^{2+}$ (2mM) por DSC.....	<b>52</b>
<b>Figura 16:</b> <i>Pull-down</i> da proteína SmE16 com soro de camundongo.....	<b>54</b>
<b>Figura 17:</b> <i>Pull-down</i> da proteína SmE16 com soro de humano.....	<b>55</b>
<b>Figura 18:</b> <i>Pull-down</i> da proteína SmE16-GST utilizando lisado de sangue de	

camundongo..... **56**

**Figura 19:** *Pull-down* da proteína SmE16-His utilizando extrato de células de macrófagos murinos..... **57**

## LISTA DE ABREVIATURAS

Asp	Ácido aspártico
ACN	acetonitrila
APO	Proteína sem presença de cálcio
Ca <sup>2+</sup>	Íons de cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CD	Dicroísmo circular
DO	Densidade óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DSS	Disuccinimidil suberato
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
DTT	Ditiotreitol
Far-UV	Ultravioleta distante
Glu	Ácido glutâmico
GST	Glutathione S-transferase
His-tag	Etiqueta de poli-histidina
IAA	iodoacetamida
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
Mg <sup>2+</sup>	Íons de magnésio

MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Near-CD	Ultravioleta próximo
Ni-NTA	Ácido Nitrilotriacético de Níquel
OMS	Organização mundial da saúde
PAGE	Eletroforese de poliacrilamida
PSIPRED	Position Specific Iterated Prediction
PZQ	Praziquantel
SEC	Cromatografia por exclusão molecular
SmE16	16 kDa calcium-binding protein
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T <sub>m</sub>	Transição térmica
Tampão A	HEPES 25 mM, pH 8,0, contendo 150 mM de NaCl e 5% de glicerol
Tampão B	Tris 25 mM, pH 8,0, contendo 100 mM de NaF
ΔH	Variação da entalpia
ΔC <sub>p</sub>	Variação da capacidade calorífica
Δε	coeficiente de extinção molar diferencial

## RESUMO

*Schistosoma mansoni* é uma espécie de parasita helminto responsável por causar a esquistossomose, doença tropical negligenciada que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo. Atualmente, o praziquantel é o principal medicamento utilizado para o combate à esquistossomose, atuando desestabilizando a homeostase de cálcio nos vermes adultos. No entanto, em regiões endêmicas, já foram registrados casos de resistência ao fármaco devido à alta taxa de reinfeção. Portanto, proteínas ligantes de cálcio são alvos promissores para intervenções futuras. A proteína SmE16 é uma proteína imunoreativa com quatro domínios EF-hand, sugerindo sua capacidade de ligação ao cálcio. Estudos do proteoma e transcriptoma do *S. mansoni* indicaram que SmE16 é uma proteína secretada e que poderia estar atuando na interface parasita-hospedeiro. Portanto, o objetivo desse trabalho é investigar a função ainda desconhecida da proteína SmE16, analisando suas interações com outras proteínas e íons através de estudos biofísicos, visando compreender seu papel nos processos biológicos. Para isso, foram realizados estudos para avaliar a ligação da proteína SmE16 a íons divalentes e sua especificidade de interação, por meio de experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Potenciais mudanças conformacionais decorrentes da interação com íons foram investigadas por difração circular (CD), eletroforese em gel de poliácridamida nativo e digestão branda com tripsina. A estabilidade térmica da proteína SmE16, na presença e ausência de cálcio, foi avaliada por meio de ensaios de calorimetria diferencial de varredura (DSC). Para a identificação de potenciais parceiros proteicos, foram realizados ensaios de *pull-down* nos quais a proteína SmE16 purificada, contendo uma His-tag, foi incubada com resina de Ni-NTA na presença de soro de camundongo, soro humano e extratos de células de mamíferos. De forma complementar, a proteína SmE16 purificada em fusão com GST, foi incubada com resina de glutationa na presença de lisados de sangue de camundongo. As proteínas coeluídas foram posteriormente identificadas por espectrometria de massas. Os resultados indicaram que a proteína SmE16 apresenta especificidade de interação a íons cálcio, promovendo alterações

estruturais, aumento da estabilidade térmica e formação parcial de dímeros. Além disso, a SmE16 interage com proteínas imunológicas do hospedeiro definitivo, incluindo componentes da imunidade inata e do sistema complemento. Nossos achados indicam que a proteína SmE16 pode atuar como sensor de cálcio e desempenhar papel na modulação da resposta imunológica na interface parasita-hospedeiro, destacando seu potencial alvo terapêutico contra a esquistossomose. Além disso, as interações observadas com proteínas do sistema imunológico do hospedeiro sugerem que a SmE16 pode desempenhar um papel relevante na interface parasita-hospedeiro, podendo contribuir para a modulação de respostas imunológicas durante a infecção.

## **ABSTRACT**

Schistosomiasis is a neglected tropical disease caused by the helminth parasite *Schistosoma mansoni* and remains a major public health concern affecting millions of people worldwide. Currently, Praziquantel is the main drug used for schistosomiasis treatment, acting through disruption of calcium homeostasis in adult worms. However, reports of reduced susceptibility and resistance to praziquantel in endemic areas, associated with high reinfection rates, highlight the urgent need to identify new therapeutic targets. In this context, calcium-binding proteins have emerged as promising candidates for future interventions. SmE16 is an immunoreactive protein containing four EF-hand domains, suggesting a potential role in calcium binding. Previous proteomic and transcriptomic analyses of *Schistosoma mansoni* indicated that SmE16 is a secreted protein that may function at the parasite-host interface. Therefore, the present study aimed to investigate the still unknown biological function of SmE16 by characterizing its interactions with ions and proteins through biochemical and biophysical approaches, in order to better understand its role in parasite biology and host-parasite interactions. The interaction of SmE16 with divalent ions and its binding specificity were evaluated by isothermal titration calorimetry (ITC). Potential ion-induced conformational changes were investigated using circular dichroism (CD), native polyacrylamide gel electrophoresis, and limited trypsin proteolysis assays. In addition, the thermal stability of SmE16 in the presence and absence of calcium was assessed by differential scanning calorimetry (DSC). To identify potential interacting partners, pull-down assays were performed using purified His-tagged SmE16 immobilized on Ni-NTA resin and incubated with mouse serum, human serum, and mammalian cell extracts. Complementary assays were also carried out using GST-fused SmE16 immobilized on glutathione resin and incubated with mouse blood lysates. Co-eluted proteins were subsequently identified by mass spectrometry. The results demonstrated that SmE16 specifically interacts with calcium ions, promoting conformational changes, increased thermal stability, and partial dimer formation. Moreover, SmE16 was found

to interact with host immune-related proteins, including components of the innate immune system and the complement cascade.

Overall, our findings suggest that SmE16 may function as a calcium sensor and play an important role in modulating immune responses at the parasite-host interface, highlighting its potential as a therapeutic target against Schistosomiasis. Furthermore, the observed interactions with host immune proteins support the hypothesis that SmE16 may contribute to parasite adaptation and immune evasion mechanisms during infection.

## JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é uma doença prevalente entre as populações socialmente vulneráveis de países em desenvolvimento. Classificada como uma doença tropical negligenciada, ela muitas vezes é subestimada pelo poder público e instituições privadas, devido ao seu impacto desproporcional sobre indivíduos de baixa renda (Engels e Zhou, 2020). Essa enfermidade acarreta significativo impacto econômico e social, causando comorbidades graves nos indivíduos afetados e até mesmo comprometendo o desenvolvimento cognitivo em crianças (Loverde, 2019a; Ezeamama *et al.*, 2019). Dentre as doenças causadas por parasitas que afetam os seres humanos, a esquistossomose é uma das mais disseminadas no mundo ficando atrás somente da malária, segundo a OMS. Atualmente, o único medicamento comercializado em larga escala para o combate da esquistossomose é o praziquantel (Abdulla *et al.*, 2009). A alta taxa de reinfecção em áreas endêmicas têm contribuído para o surgimento de casos documentados de resistência do parasita ao fármaco (Wang *et al.*, 2012).

A proteína SmE16 é predita como ligante de cálcio devido à presença de domínios EF-hand, mas sua função biológica permanece pouco compreendida. Dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a proteína SmE16 sofre modificações em sua conformação na presença de íons cálcio. Essas mudanças estruturais são frequentemente associadas a proteínas que atuam como sensores de cálcio, sugerindo um potencial papel funcional para a SmE16 como um sensor ativo para este íon. Além disso, sendo uma proteína secretada pelo parasita que consegue evadir o sistema imunológico humano e persistir por até trinta anos dentro do hospedeiro, seu estudo é crucial para entender os mecanismos de evasão desses organismos. Sua homóloga em *S. japonicum*, a SjE16, é um potente recrutador de neutrófilos, iniciando o granuloma inflamatório associado aos ovos, a principal causa da morbidade da esquistossomose (Fang *et al.*, 2015). Esses achados ressaltam a importância dessa proteína em possíveis vias de sinalização celular, abrindo novas perspectivas para investigações mais aprofundadas sobre seu papel biológico e suas interações com o cálcio

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doenças tropicais negligenciadas: desafios e perspectivas

Doenças tropicais negligenciadas (DTNs) consistem em doenças marginalizadas nas agendas políticas e científicas do mundo e que, atualmente, ainda representam um desafio significativo para a saúde pública, afetando principalmente regiões tropicais e subtropicais do mundo (ENGELS; ZHOU, 2020). As DTNs estão associadas a condições socioeconômicas desfavoráveis, impactando de forma desproporcional populações que vivem em situações de pobreza ou extrema pobreza que é perpetuada devido a limitação de acessibilidade a cuidados básicos como de saúde, saneamento básico e água potável, sendo, portanto, determinantes para a desigualdade na saúde global. (Molyneux *et al.*, 2021).

Atualmente, de acordo com a Organização mundial da saúde (OMS), 20 DTNs são destacadas como líderes em casos de prevalência e incidência mundialmente e são causadas por diferentes organismos como vírus, bactérias, protozoários e helmintos (Hotez *et al.*, 2020). Dentre esse grupo, as infecções causadas por parasitas helmintos se destacam devido pela sua ampla distribuição geográfica, elevada prevalência e pela necessidade recorrente de estratégias de quimioterapia preventiva, permanecendo endêmica, principalmente em países do continente africano, americano e asiático (Stolk *et al.*, 2016). Apesar dos avanços através do programa de quimioterapia preventiva e controle, a persistência dessas infecções reforçam a importância de estudos que contribuam para compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na infecção, bem como no desenvolvimento de novas abordagens para o controle dessas doenças (OMS, 2020).

Os parasitas helmintos consistem em organismos multicelulares pertencentes, principalmente, a dois grandes filos, Nematoda (nematelmintos) que são caracterizado pelo seu corpo cilíndrico e não segmentado, e o Platyhelminthes (platelmintos), possuindo seu corpo achatado (Hotez *et al.*, 2008a). Os helmintos são parasitas que possuem alta complexidade de interação e adaptação afetando o sistema biológico de diferentes organismos vertebrados, dentre eles os humanos, que atuam como hospedeiros de diversas espécies destes parasitas. Os seres humanos são infectados através da ingestão de ovos ou larvas presentes em água ou alimentos contaminados, pela da penetração de larvas na pele e também por

meio da transmissão vetorial (KING, 2019). Diferentes estratégias de infecção foram desenvolvidas pelos helmintos, garantindo a sua sobrevivência e manutenção no hospedeiro humano através da sua capacidade imunomoduladora, afetando de diferentes formas a resposta imune do hospedeiro (Lebu *et al.*, 2023).

Os nematelmintos consistem em parasitas intestinais ou filarióides que ocasionam doenças como a filariose linfática, conhecida como elefantíase, e oncocercose, popularmente como cegueira do rio, ambas doenças distribuídas em regiões tropicais e associadas a casos clínicos e incapacitantes (Hotez *Et Al.*, 2008b; King, 2019). Os platelmintos incluem a classe de vermes denominada cestoda, dentre eles a tênia, conhecida popularmente como lombriga e a classe trematoda, grupo ao qual pertence o gênero *Schistosoma*, causador da esquistossomose, conhecida popularmente como barriga d'água (Collins, 2017).

A elevada taxa de reinfeção em áreas endêmicas representa um dos principais obstáculos para o controle e erradicação das doenças causadas pelos parasitas. Além disso, a dependência de um número restrito de fármacos para o tratamento dessas infecções aumenta o risco de surgimento e disseminação de resistência parasitária, comprometendo a eficácia das estratégias terapêuticas atualmente disponíveis (Campos-Toimil, 2012).

## 1.2 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença crônica causada por parasitas trematódeos do gênero *Schistosoma*, classificada como uma das DTNs de maior impacto global (OMS, 2023). Apesar dos avanços científicos, a infecção ainda permanece amplamente distribuída, afetando mais de 200 milhões de pessoas em mais de 70 países, especialmente em regiões marcadas por pobreza, saneamento precário e contato frequente com corpos d'água doce contaminados. Essa persistência da doença ao longo dos anos evidencia não apenas desafios na ciência e medicina, mas também limitações históricas e estruturais nas estratégias de combate contra a doença (Brightman, 2011; Pirzaman *et al.*, 2024).

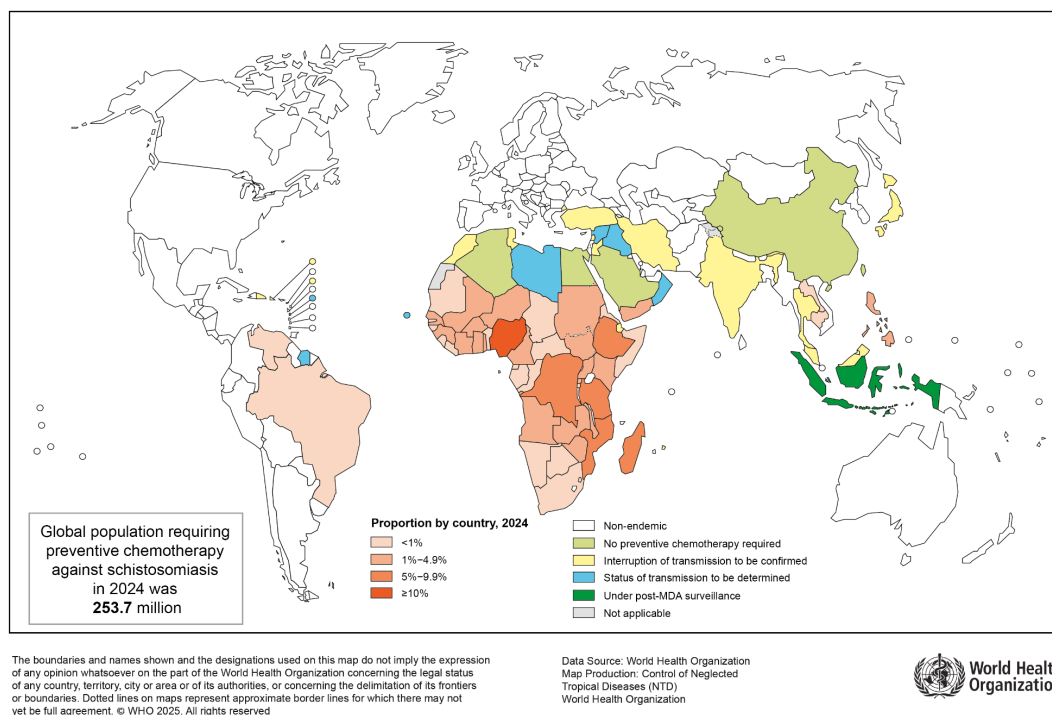
Historicamente, evidências arqueológicas indicam a presença da esquistossomose na humanidade há milênios, sendo descritos por historiadores gregos e romanos como o Heródoto, que descreveu no Egito a ocorrência de

hematúria (associada posteriormente à forma urinária da esquistossomose) ao afirmar que “os homens menstruam” (Mahmoud, 2004).

Entretanto, os primeiros registros dos organismos causadores foi na década de 1852, através de uma autópsia realizada pelo médico alemão Theodor Bilharz. Foram identificados ovos calcificados de *Schistosoma* em tecidos renais de múmias egípcias da vigésima dinastia (1250–1000 a.C.), fornecendo uma das primeiras evidências diretas da infecção em populações antigas, demonstrando que a doença já era endêmica no Egito Antigo (Ruffer, 1910).

Atualmente, a esquistossomose ainda permanece como um importante problema de saúde pública em diferentes regiões do mundo. Segundo a OMS, mais de 250 milhões de pessoas necessitam de quimioterapia preventiva contra a esquistossomose, com maior concentração de indivíduos presentes na África Subsaariana, seguida por países da América do Sul, com destaque para o Brasil, além de regiões do Sudeste Asiático e do Oriente Médio. Essas regiões são evidenciadas pelas colorações vermelha e rosa no mapa apresentado na Figura 1 (OMS, 2025).

Proportion (%) of global population requiring preventive chemotherapy against schistosomiasis, 2024

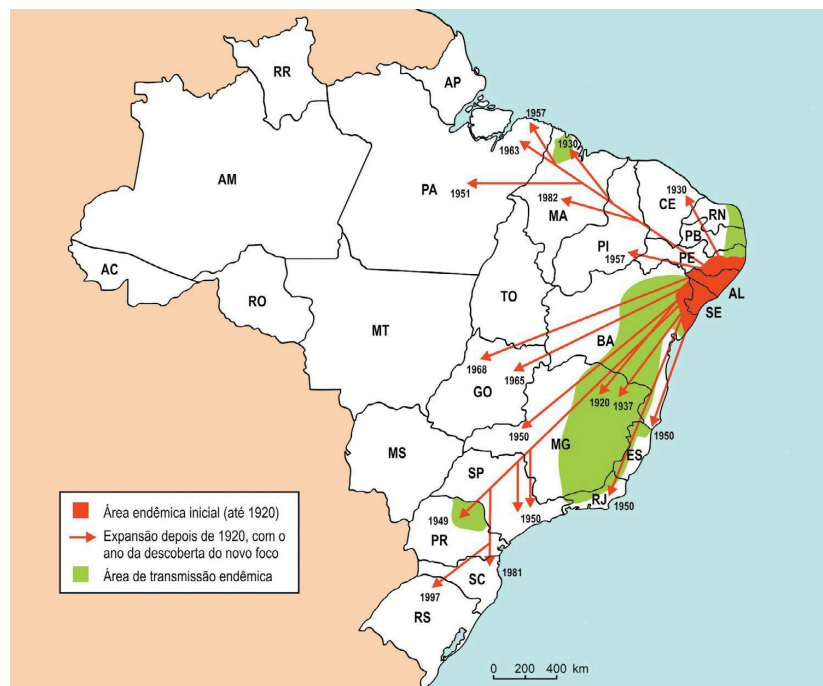


**Figura 1: Mapa demonstrando a persistência global da esquistossomose e necessidade contínua de quimioterapia no ano de 2024.** O mapa indica faixas percentuais da população em risco, destacando países com  $\geq 10\%$  (vermelho) e 5–9,9% (rosa) da população necessitando de tratamento preventivo. Fonte: World Health Organization (WHO), 2025.

Existem 6 espécies de *Schistosoma* que infectam os seres humanos, dentre esses três principais, sendo eles *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma mansoni*, que se destaca como o principal agente etiológico da esquistossomose intestinal no continente americano, sendo responsável por elevadas taxas de morbidade no Brasil.

No Brasil, a introdução da esquistossomose se deu, principalmente, durante o período colonial através de pessoas escravizadas oriundas do continente africano. Recife e Salvador eram importantes centros de desembarque que foram, posteriormente, destinados às lavouras de cana-de-açúcar. A doença se expandiu de forma progressiva para as regiões do território brasileiro, principalmente para o nordeste e sudeste do país, que são regiões favorecidas devido às condições ambientais que favorecem a manutenção dos hospedeiros intermediários e por

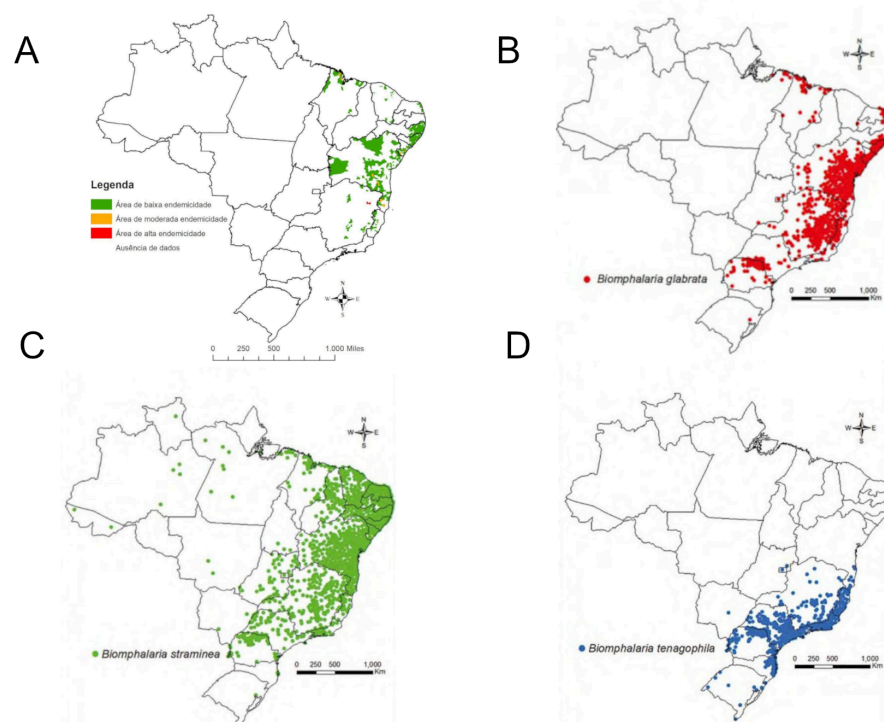
fatores socioeconômicos, ocasionando uma extensa área de transmissão (Figura 2) (Rey, 2008; Katz, 2018; Ministério Da Saúde, 2024a).



**Figura 2: Expansão histórica da área endêmica da esquistossomose no Brasil, desde o foco inicial até a consolidação das áreas atuais de transmissão.** O mapa evidencia a dinâmica da expansão da esquistossomose desde o foco inicial na região do nordeste até sua expansão para outras regiões associadas a movimentações populacionais e condições socioambientais favoráveis. Fonte: Vigilância da esquistossomose: Diretrizes técnicas, 2024. Adaptações feitas por Heloisa M. N. Diniz.

A presença do hospedeiro intermediário, representado por caramujos do gênero *Biomphalaria*, é essencial para a manutenção do ciclo de vida do *S. mansoni*, condicionando a distribuição da doença no mundo. No Brasil, a doença se mantém concentrada em regiões onde a transmissão permanece ativa, mostrando diferentes níveis de endemicidade, conforme ilustrado no mapa de distribuição nacional (Figura 3-A). Essa distribuição coincide com a ampla ocorrência das principais espécies de *Biomphalaria* no território brasileiro, especialmente *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* (Figuras 3B–D), contribuindo de forma significativa para a persistência da doença no país. Em razão da extensão dessas áreas e do número expressivo de indivíduos acometidos por formas graves da infecção, o Brasil é reconhecido como uma das regiões mais afetadas pela esquistossomose (Silva da Paz et al., 2021).

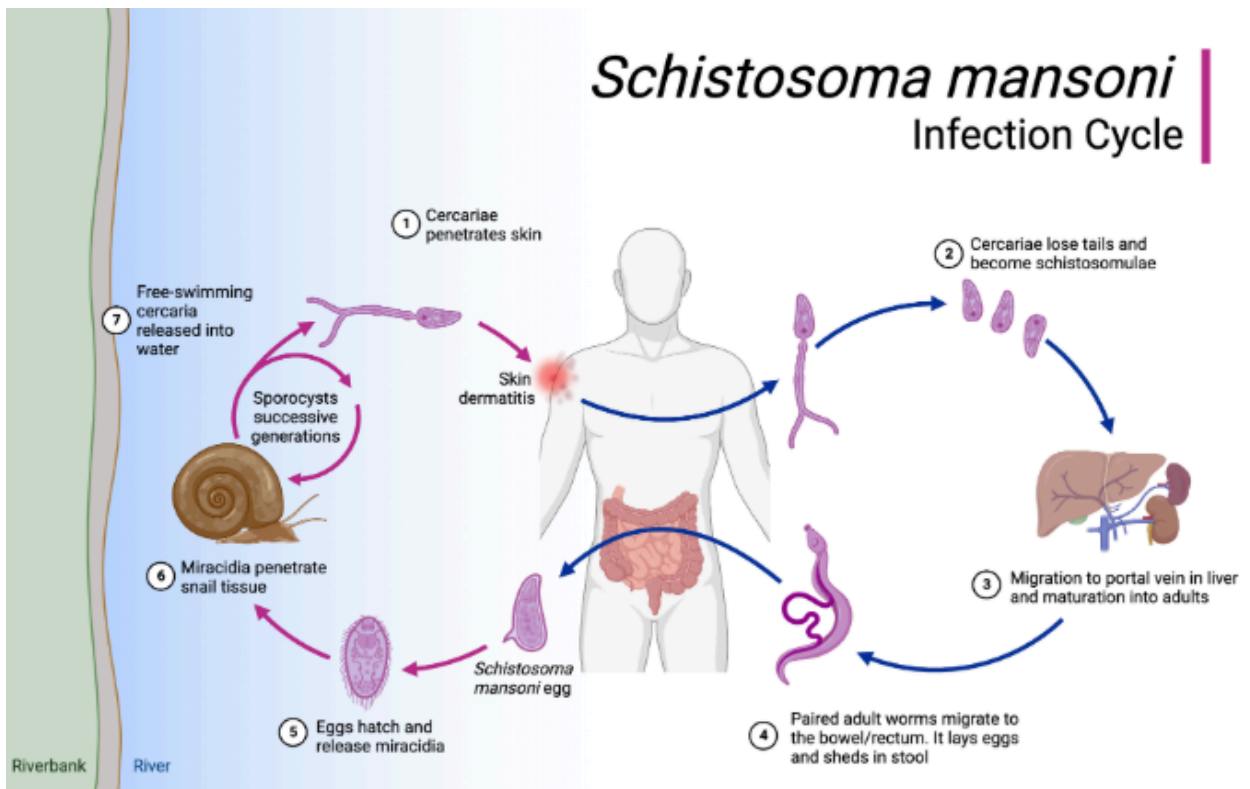
Indivíduos afetados pela esquistossomose podem enfrentar complicações graves da doença, como incapacidade crônica, anemia crônica, dor abdominal, diarreia, entre outros, podendo, em casos severos, levar à morte ou comprometer significativamente a qualidade de vida (Loverde, 2019b). A infecção apresenta dois estágios distintos: a fase aguda, caracterizada pela formação de granulomas ao redor dos ovos liberados pela fêmea em diferentes partes do corpo, principalmente no pulmão, fígado e linfonodos. A segunda fase é a crônica, nessa fase a infecção é assintomática, principalmente, em indivíduos que habitam áreas endêmicas (Carafoli e Krebs, 2016; Ministério Da Saúde 2024b).



**Figura 3: Distribuição da esquistossomose e de seus hospedeiros intermediários no Brasil.** (A) Regiões classificadas segundo diferentes níveis de endemicidade da esquistossomose no ano de 2019. (B–D) Distribuição geográfica das principais espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria*: *B. glabrata* (B), *B. straminea* (C) e *B. tenagophila* (D). Fonte: Diretrizes técnicas, 2024. Adaptações feitas pela autora do trabalho.

### 1.2.1 Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

O *S.mansoni* possui o ciclo de vida complexo, se iniciando com a eliminação de ovos nas fezes de indivíduos infectados, que em ambientes de água doce, eclodem e liberam miracídios multiciliados, fase do ciclo de vida livre. Esses miracídios apresentam curto período de sobrevivência no ambiente e necessitam infectar rapidamente caracóis do gênero *Biomphalaria*, que atuam como hospedeiros intermediários, indispensáveis para a manutenção do ciclo. Nos caramujos, os miracídios se diferenciam em esporocistos, que irão se multiplicar e posteriormente produzirão as cercárias, forma do ciclo de vida infectante para o hospedeiro vertebrado. Os seres humanos atuam como hospedeiros definitivos do *S. mansoni* e, após as cercárias penetrarem em sua pele, irão se desenvolver em esquistossômulos e migrar através dos vasos mesentéricos até o fígado, onde ocorre a maturação para sua fase adulta (Figura 4). A maturação sexual ocorre entre a quarta e sexta semana após a infecção. As fêmeas do *S. mansoni* produzem cerca de 300 ovos por dia, alguns dos quais são excretados nas fezes, reiniciando o ciclo (Loverde, 2019c; Mcmanus *et al.*, 2018a).



**Figura 4: Esquema demonstrando o ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*.** O esquema ilustra as principais etapas do ciclo, incluindo a liberação de cercárias pelo hospedeiro intermediário, a penetração ativa das cercárias na pele humana, a migração e maturação dos esquistossômulos no sistema porta-hepático, a diferenciação em vermes adultos e a eliminação de ovos nas fezes que, ao alcançarem ambientes aquáticos, dão origem aos miracídios, reiniciando o ciclo. Fonte: adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>.

### 1.2.2 Capacidade do *Schistosoma* em modular a resposta imune do hospedeiro

A esquistossomose é caracterizada por ser uma infecção na qual o parasita é capaz de sobreviver por longos períodos no hospedeiro, mesmo após a ativação do sistema imune. Isso ocorre devido à capacidade do parasita de modular a resposta imune do hospedeiro através de diferentes estratégias, como o mimetismo molecular, que consiste na expressão de moléculas pelo parasita apresentando similaridades estruturais, funcionais ou antigênicas com componentes do hospedeiro, reduzindo o reconhecimento imunológico e favorecendo a evasão da resposta imune (Hambrook *et. al*, 2021a; Damian, 1964; Damian, 1987).

Após a infecção, diferentes tipos de resposta imune têm sido descritos na literatura, variando de acordo com o estágio do parasita e com o momento da infecção. Estudos mostraram que nas fases iniciais da infecção podem ser observadas respostas associadas à citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, no início da oviposição, antígenos derivados dos ovos estão associados ao desenvolvimento de respostas do tipo Th2, produzindo citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 que estão relacionados à formação de granulomas ao redor dos ovos no fígado (Everts *et al.*, 2012; Pearce *et al.*, 2002). Nesse contexto, o mimetismo molecular constitui um importante mecanismo de evasão imune do *Schistosoma*, uma vez que a expressão de moléculas semelhantes às do hospedeiro reduz o reconhecimento do verme como invasor e favorece sua permanência prolongada no organismo. Essa persistência permite a produção contínua de ovos, cujos antígenos sustentam a ativação da resposta Th2 e, conseqüentemente, a manutenção da reação granulomatosa que caracteriza a patogênese da esquistossomose (Hambrook *et al.*, 2021b).

Compreender esses processos é fundamental para o entendimento da biologia do parasita e para o desenvolvimento de novas estratégias de controle e tratamento da esquistossomose (Maizels e Yazdanbakhsh, 2003; Mcmanus *et al.*, 2018b).

### 1.2.3 Tratamento contra esquistossomose

Atualmente, o principal medicamento comercializado utilizado em larga escala para o combate da esquistossomose é o praziquantel (PZQ). Devido a sua alta eficácia em vermes adultos, com uma única dose administrada oralmente, sua segurança e seu baixo custo, o medicamento é consolidado como principal ferramenta terapêutica no combate à doença (Cioli *et al.*, 2012). O mecanismo de ação do medicamento ainda é pouco compreendido, entretanto, estudos indicam que o mecanismo de ação envolve desestabilização da homeostase de cálcio em vermes adultos, aumentando a permeabilidade do tegumento aos íons de  $Ca^{2+}$ , resultando na contração muscular sustentada, paralisia espástica e danos tegumentares, facilitando a eliminação dos vermes pelo sistema imunológico do hospedeiro (Eastham *et al.*, 2024; Doenhoff *et al.*, 2008a).

Apesar de sua ampla utilização, o PZQ possui limitações, como sua baixa eficácia contra formas imaturas do parasita, especialmente os esquistossômulos, resultando em taxas de cura reduzidas em regiões hiperendêmicas, devido a alta probabilidade de infecções recentes de indivíduos ainda em fase de tratamento, contribuindo para a ocorrência de reinfecções e na persistência de transmissões (Doenhoff *et al.*, 2008b; McManus *et al.*, 2018c). Além disso, outro desafio relevante é a dependência quase exclusiva de um único fármaco para o controle da doença. O uso contínuo e em larga escala do praziquantel em áreas de alta endemicidade tem suscitado preocupações na comunidade científica quanto ao surgimento de resistência ou à redução da sensibilidade ao tratamento. Embora casos confirmados de resistência clínica ainda sejam restritos, estudos já vêm demonstrando variações na resposta ao praziquantel em diferentes populações de *Schistosoma*, sugerindo que a pressão seletiva exercida devido ao uso contínuo do medicamento pode comprometer sua eficácia a longo prazo (Melman *et al.*, 2009; Vale *et al.*, 2017).

É importante destacar que além do tratamento farmacológico, são necessárias implementações de estratégias complementares para o controle efetiva da esquistossomose, como melhorias no saneamento básico, acesso à água potável e tratamento adequado de esgoto, medidas fundamentais para interromper a contaminação de ambientes aquáticos por ovos do parasita (WHO, 2023, King *et al.*, 2015). Paralelamente, investimentos em pesquisa voltados à biologia molecular do parasita, mecanismos de sinalização celular e às interações parasita-hospedeiro são fundamentais para a identificação de novos alvos farmacológicos (Cioli *et al.*, 2014; Loverde, 2019).

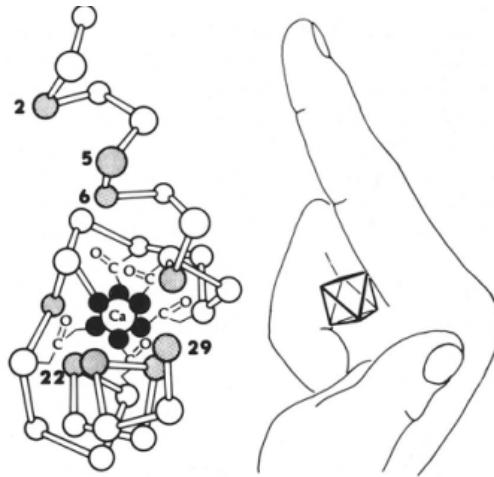
## 1.2 Proteínas ligantes a cálcio

O cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) é um dos íons mais importantes para a manutenção da vida, regulando diferentes processos celulares em eucariotos, atuando como segundo mensageiro em vias de sinalização envolvidas em funções fisiológicas como na contração muscular, metabolismo, desenvolvimento, morte e proliferação celular. Íons de  $\text{Ca}^{2+}$  possuem a capacidade de modular de forma rápida e eficaz a sua concentração intracelular em resposta a estímulos internos e externos em processos controlados pela coordenação de proteínas especializadas na ligação, no transporte e regulação deste íon (ZHENG; ZENG; WANG, 2015).

Proteínas ligantes a cálcio são grupos de moléculas capazes de desempenhar papéis fundamentais na manutenção da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  e na transdução de sinais celulares. Possuem uma ampla diversidade estrutural e funcional que são coordenados, principalmente, por resíduos de aminoácidos, resultando em mudanças estruturais e funcionais das proteínas. Podem ser classificadas como proteínas sensores, respondendo a variações na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  por meio de significativas alterações conformacionais, ativando diferentes cascatas de sinalizações ou tamponadoras atuando na regulação e controle da disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, contribuindo para a homeostase. Essas proteínas apresentam diferentes motivos e domínios responsáveis pela coordenação desses íons, dentre eles a EF-hand.

### 1.2.1 Família EF-hand

Proteínas da família EF-hand compreendem um grande grupo de proteínas ligantes a cálcio em eucariotos, atuando em diversos processos celulares dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . O termo EF-hand consiste em um motivo estrutural conservado, caracterizado pela organização em hélice-loop-hélice, no qual as  $\alpha$ -hélices, denominadas E e F, são conectadas pela região loop responsável pela coordenação dos íons (Figura 5).



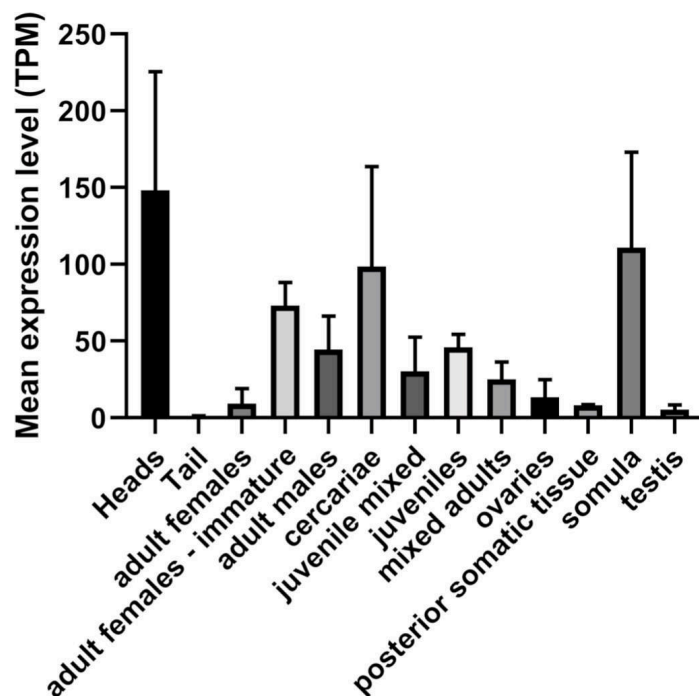
**Figura 5: Representação do motivo EF-hand, responsável pela ligação ao cálcio.** Motivo EF-hand de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , com estrutura hélice-loop-hélice e analogia à posição do polegar e do dedo indicador da mão humana. Fonte: The Calcium Channel: Structure, Function and Implications © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1988

O domínio EF-hand possui comumente 12 resíduos de aminoácidos que participam diretamente da coordenação do  $\text{Ca}^{2+}$ , no qual átomos de oxigênio provenientes de resíduos ácidos, grupos carbonila e moléculas de água coordenam o íon  $\text{Ca}^{2+}$  em uma geometria característica. Essa arquitetura confere elevada afinidade e especificidade pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , permitindo que pequenas variações na concentração intracelular do íon sejam detectadas e convertidas em respostas celulares. Além disso, a ligação ao cálcio promove mudanças conformacionais significativas, afetando sua estrutura tridimensional e modulando suas propriedades funcionais (Kawasaki et.al, 2017; Yáñez, et.al. 2021).

### 1.3 Proteína SmE16

A proteína SmE16, também denominada 16 kDa calcium-binding protein ou Egg antigen SmE16 (UniProt: Q07167, Smp\_096390) é uma proteína imunorreativa, ligante a cálcio, que foi descoberta na década de 1990 e descrita inicialmente como específica de ovos de *Schistosoma mansoni*. Através da triagem de uma biblioteca de cDNA derivada de ovos do *S. mansoni*, obtidos de pacientes infectados, o gene da SmE16 foi identificado em estudos que buscavam potenciais marcadores de diagnósticos e candidatos vacinais contra a esquistossomose. (MOSER; DOENHOFF; KLINKERT, 1992). A denominação SmE16 foi atribuída em função de seu peso molecular aproximado de 16 kDa e de sua associação inicial como

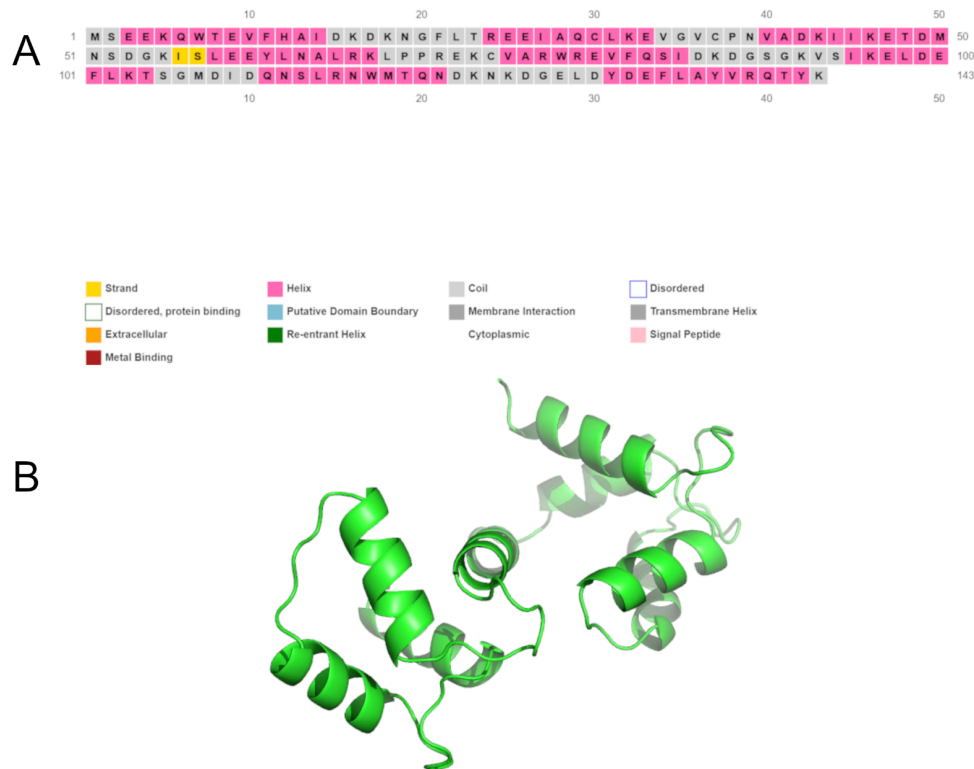
proteína específica de ovos do verme. Entretanto, atualmente, estudos baseados em análises transcriptômicas e proteômicas demonstraram que a SmE16 não se restringe aos ovos, apresentando elevados níveis de expressão em diferentes estágios do ciclo de vida do verme, incluindo vermes adultos (MACIEL et al., 2019; Figueiredo *et al.*, 2025) (Figura 6). Além disso, essa proteína é secretada pelo parasita e pode ser detectada no material regurgitado por vermes adultos, indicando um possível envolvimento em processos fisiológicos associados à interação parasita-hospedeiro (HALL et al., 2011), sugerindo que a SmE16 desempenha funções biológicas além dos que as propostas inicialmente.



**Figura 6: Níveis de expressão da proteína SmE16 em diferentes estágios de desenvolvimento e tecidos de *Schistosoma mansoni*.** A expressão média é apresentada em transcripts per million (TPM), com base em dados de bibliotecas públicas de RNA-seq de *S. mansoni* compiladas por Maciel et al. (2019). Fonte: Figueiredo *et al.* (2025). Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM)

A proteína SmE16 é composta por 143 resíduos de aminoácidos e apresenta quatro domínios do EF-hand. Predições de estrutura secundária indicam que a proteína possui uma organização predominantemente  $\alpha$ -helicoidal, intercalada por regiões em alça, característica comum a proteínas globulares envolvidas em processos de ligação a íons e interações moleculares (Figura 7-A). Modelos de

organização tridimensional gerados pelo alphafold indicam que os elementos de estrutura secundária se organizam espacialmente de forma consistente ao longo da proteína (Figura 7-B), fornecendo um contexto estrutural inicial para a compreensão de suas possíveis características conformacionais e de sua função como proteína ligante a cálcio.



**Figura 7: Predição estrutural da proteína SmE16.** A estrutura secundária feita pelo PSIPRED indica predominância de regiões  $\alpha$ -helicoidais, enquanto a estrutura terciária, predita pelo AlphaFold, revela uma conformação  $\alpha$ -helicoidal, compatível com proteínas ligantes de cálcio.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é investigar a função ainda não compreendida da proteína SmE16 através de estudos biofísicos, explorando suas potenciais interações com outras proteínas e sua afinidade por íons. Desta forma, buscamos obter compreensão mais abrangente dos mecanismos envolvidos em seu funcionamento e elucidar seu papel em processos biológicos.

## 2.2 Objetivos específicos

- 1) Realizar a expressão heteróloga e purificação da proteína SmE16;
- 2) Avaliar a ligação da proteína SmE16 por cálcio e outros íons divalentes por meio da técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC);
- 3) Avaliar mudanças conformacionais da proteína SmE16 na presença de íons de cálcio;
- 4) Avaliar a estabilidade térmica da proteína SmE16 na presença e na ausência de cálcio utilizando a técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC);
- 5) Investigar possíveis alterações no estado oligomérico da proteína SmE16 na presença de cálcio e outros íons divalentes por meio de cromatografia de exclusão molecular (SEC) e crosslinking químico;
- 6) Detectar e isolar parceiros protéicos da proteína SmE16 por meio de ensaios de *pull-down*, utilizando amostras de soro de camundongo, soro humano e extratos celulares do hospedeiros definitivo, e identificar as proteínas interagentes por espectrometria de massas.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1 Análise comparativa das sequências proteicas da SmE16 e proteínas da família EF-hand em helmintos.

A sequência de aminoácidos da proteína SmE16 de *Schistosoma mansoni* foi obtida a partir do banco de dados público National Center for Biotechnology Information (NCBI), em formato FASTA. Realizamos análise comparativa da SmE16 com as duas calmodulinas anotadas de *Schistosoma*. As sequências de aminoácidos foram submetidas a alinhamento múltiplo utilizando o algoritmo MAFFT, acessado por meio do software Jalview. A partir do alinhamento, foram avaliados os níveis de conservação de resíduos ao longo das sequências, bem como as substituições de aminoácidos. Para facilitar a análise visual, foram aplicados esquemas de coloração baseados nas propriedades físico-químicas dos aminoácidos, permitindo a identificação de resíduos ácidos, como aspartato e glutamato, frequentemente associados à coordenação de íons cálcio.

### 3.2 Expressão e purificação da proteína SmE16

Para obter a proteína SmE16 de forma recombinante foram realizadas etapas de clonagem, expressão heteróloga em sistema bacteriano e purificação por cromatografia por afinidade seguida por cromatografia por exclusão molecular (SEC). A região codificante da SmE16 já estava inserida no vetor de expressão pET28a(+), previamente construída pela orientadora deste trabalho. Para a produção da proteína, o plasmídeo foi transformado na linhagem *Escherichia coli* Rosetta (DE3). Uma colônia proveniente dessa placa foi inoculada em 5 mL de meio LB, contendo canamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). Após 16 horas a 37 °C, com agitação a 250 rpm, o pré-inóculo resultante foi diluído em meio de cultura LB, mantendo os mesmos antibióticos, numa proporção de 1:50. Ao atingir a densidade óptica de 0,7-0,8 a 600 nm, a expressão de SmE16 foi então induzida pela adição de IPTG em concentração de 0,4 mM. As células foram incubadas por 16 horas a 18 °C, sob agitação a 150 rpm. A expressão da proteína de interesse foi confirmada posteriormente através de SDS-PAGE (15%).

Após o período de expressão, a suspensão celular foi centrifugada a 4.500 RPM por 30 minutos a 4 °C, utilizando a centrífuga de alto desempenho Avanti JXN-26 (Beckman Coulter), na Plataforma Integrada de Expressão, Purificação e Caracterização de Proteínas Recombinantes (PIEPPR) – FINEP PRO-INFRA 2021-LFBM/ UENF. Em seguida, o pellet celular foi ressuscitado em 30 mL de tampão HEPES 25 mM, pH 8,0, contendo 150 mM de NaCl e 5% de glicerol (tampão A) e submetido a ruptura celular por sonicação durante 10 min (30s ON e 40s OFF), mantendo-se a amostra em banho de gelo.

A separação das proteínas solúveis do pellet foi realizada por centrifugação a 12.000 RPM por 30 minutos a 4 °C. Em seguida, foi conduzida a cromatografia de afinidade, na qual o sobrenadante foi incubado por 1 hora e 30 minutos a 4 °C, em uma coluna, previamente equilibrada com o tampão A, contendo aproximadamente 3 mL de resina de Ni-NTA (Qiagen). Após a passagem do sobrenadante, iniciamos a lavagem da resina com 30 mL de tampão A e, posteriormente, adicionamos em 30 mL do tampão A, 10 mM de imidazol. A eluição da proteína de interesse foi realizada em 5 mL de tampão A contendo 500 mM de imidazol. Para garantir a ausência de cálcio residual proveniente da expressão em *E. coli*, as frações eluições foram tratadas com 2 mM de EDTA. Em seguida foi adicionado ao protocolo uma segunda etapa de purificação através da SEC, utilizando uma coluna Superdex 75 acoplada

ao sistema AKTA go (Cytiva). O tampão A foi utilizado como fase móvel, com um fluxo de 0,5 mL/min, e 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 concentração protéica das frações obtidas foi determinada através de medidas de absorbância a 280 nm, utilizando um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Para o cálculo da concentração, foi empregado o coeficiente de extinção molar estimado a partir da sequência de aminoácidos da proteína, por meio da ferramenta ProtParam.

### **3.3 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)**

Os experimentos de ITC foram realizados com o objetivo de avaliar a ligação e afinidade da proteína SmE16 por íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ). A proteína SmE16 foi utilizada a uma concentração de 250  $\mu\text{M}$  e inserida na célula de amostra do equipamento. Essa mesma concentração de proteína foi empregada em experimentos independentes de ITC, nos quais soluções de  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgCl}_2$ , preparadas nas concentrações de 2 mM e 4 mM, respectivamente, foram carregadas separadamente na seringa de titulação. Para evitar variação no sinal de calor decorrentes de diferenças na composição do tampão, alíquotas do mesmo tampão utilizado nas etapas de purificação foram empregadas nos experimentos de ITC.

As análises foram conduzidas em um microcalorímetro nano-ITC (TA Instruments), operando à temperatura constante de 25 °C. As titulações consistiram em 20 injeções consecutivas de 2  $\mu\text{L}$  do ligante. Os dados de fluxo de calor obtidos foram integrados e corrigidos pelo calor de diluição do titulante, determinado em experimentos controle realizados pela titulação das soluções de íons no tampão. O tratamento e a análise dos dados foram realizados utilizando software específico para análises de ITC (NanoAnalyze – TA Instruments).

### **3.4 Espectroscopia de dicroísmo circular**

Os experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foram realizados com o objetivo de avaliar as características estruturais da proteína SmE16 nas regiões do ultravioleta distante (far-UV) e do ultravioleta próximo (near-CD) (Fasman,1996). As medidas foram conduzidas em um

espectropolarímetro Jasco J-815, operando sob temperatura de 20 °C. Os espectros de CD na região de far-UV (190–260 nm) foram obtidos utilizando a proteína SmE16 na concentração de 5 µM, preparada em tampão Tris 25 mM, pH 8,0, contendo 100 mM de NaF (tampão B). Para as análises na região de near-UV (260–320 nm), a proteína foi utilizada na concentração de 288 µM, no mesmo tampão. Os espectros foram registrados com velocidade de varredura de 100 nm/min e largura de banda de 1 nm. Cada espectro correspondeu à média de seis varreduras consecutivas, realizadas nas mesmas condições experimentais, com o objetivo de melhorar a razão sinal/ruído. Espectros do tampão foram registrados nas mesmas condições experimentais e subtraídos dos espectros das amostras contendo a proteína. A análise dos dados consistiu na média dos espectros obtidos, seguida da conversão das unidades de elipticidade para coeficiente de extinção molar diferencial ( $\Delta\epsilon$ ), utilizando o software CDtoolX (Lees *et al.*, 2004).

### **3.5 Eletroforese de poliacrilamida nativa e SDS-PAGE após digestão branda com tripsina**

Análises do perfil eletroforético foram realizadas com o objetivo de avaliar potenciais alterações conformacionais da proteína SmE16 na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , através de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições nativas, de forma complementar, os padrões de clivagem gerados pela digestão proteolítica branda com tripsina foram avaliados por SDS-PAGE.

A eletroforese em condições nativas foi realizada em géis de poliacrilamida preparados sem a adição de SDS ou agente redutores como  $\beta$ -mercaptoetanol. A proteína SmE16 foi utilizada a uma concentração de 40 µM, em tampão A, nas condições apo (na ausência de íons), na presença de 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  ou de 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Todas as amostras foram previamente incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente antes da aplicação nos géis. Com o objetivo de preservar a conformação nativa da proteína durante a corrida eletroforética, os géis foram mantidos em banho de gelo ao longo de todo o experimento.

Para a análise por SDS-PAGE associada à digestão branda com tripsina, foi preparada uma solução estoque de tripsina a 25 mg/mL, a qual foi utilizada em diluição final de 1:400 (0,06 mg/mL). A proteína SmE16 foi empregada a uma concentração de 40 µM, em tampão A, nas condições apo, na presença de 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  e de 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Todas as amostras submetidas à digestão com tripsina

foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Ambos os experimentos foram conduzidos em gel de poliacrilamida a 15%.

### **3.6 Ensaios de crosslinking químico e cromatografia por exclusão molecular (SEC)**

Experimentos de crosslinking químico e SEC foram realizados com o objetivo de avaliar o estado oligomérico da proteína SmE16 sob diferentes condições experimentais. Para isso, foi preparada uma solução estoque de disuccinimidil suberato (DSS) a 100 mM, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. Utilizamos 40 µM da proteína SmE16, em tampão A, sendo avaliada nas condições apo, na presença de 2 mM de CaCl<sub>2</sub> e de 2 mM de MgCl<sub>2</sub>. Para cada condição experimental, a proteína foi incubada com DSS em concentração final de 2 mM. As reações foram conduzidas por 1 hora à temperatura ambiente e posteriormente as amostras foram analisadas por SDS-PAGE.

Para os experimentos de cromatografia por exclusão molecular (SEC), a separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) acoplada a um sistema AKTA go (Cytiva). As análises foram conduzidas a fluxo constante de 0,5 mL/min, com monitoramento da eluição por absorbância a 280 nm.

Na condição apo, a proteína SmE16 foi utilizada a uma concentração de 44 µM, preparada em tampão A e submetida à análise cromatográfica. Para as análises na presença dos íons , a proteína SmE16, na mesma concentração, foi previamente incubada com 2 mM de CaCl<sub>2</sub> ou 2 mM de MgCl<sub>2</sub> por 30 minutos a 4 °C. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas à análise cromatográfica. Para cada condição experimental, a coluna foi previamente equilibrada com o tampão correspondente à amostra analisada. Portanto, para as corridas realizadas na condição apo, foi utilizado tampão A como fase móvel, enquanto, para as análises na presença de íons divalentes, foi adicionado ao tampão A 2 mM de CaCl<sub>2</sub> ou 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, conforme a condição avaliada.

### 3.7 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os experimentos de desnaturação térmica da proteína SmE16 foram realizados por calorimetria diferencial de varredura (DSC), utilizando um equipamento NanoDSC (TA Instruments, New Castle, Delaware, EUA), operando sob pressão constante de 6 atm. As medidas foram conduzidas no intervalo de temperatura de 20 a 130 °C, com taxa de aquecimento de 1 °C/min. Para este experimento utilizamos tampão HEPES 25 mM, pH 8,0, 150 mM de NaCl (tampão C), tanto na condição apo quanto na presença de 2 mM de CaCl<sub>2</sub>. Para ambas as condições foi utilizado 100 µM da proteína SmE16. Para os experimentos na presença de cálcio, a proteína foi previamente incubada com o íon antes da realização das análises. A célula de amostra foi preenchida com a proteína, enquanto a célula de referência foi preenchida com o tampão correspondente a cada condição experimental. Os dados foram normalizados em função da taxa de aquecimento e corrigidos pela subtração da linha de base, determinada a partir das regiões pré- e pós-transição dos termogramas. Foram realizadas varreduras do tampão para correção adicional da linha de base, e os termogramas finais foram normalizados pela concentração da proteína. A análise dos dados foi realizada com o auxílio do software NanoAnalyze Data Analysis (versão 3.12.5).

### 3.8 Pull-down de proteínas

Os ensaios de *pull-down* foram realizados para investigar possíveis interações entre a proteína SmE16 e proteínas do hospedeiro, utilizando duas estratégias de captura por afinidade. Para isso, a proteína SmE16 foi expressa de forma recombinante contendo diferentes tags de afinidade. SmE16 foi fusionadas à etiqueta de poli-histidina (His-tag) ou à glutationa S-transferase (GST), permitindo a captura de proteínas potencialmente interagentes a partir de amostras biológicas. Os experimentos foram conduzidos na condição apo e na presença de cálcio, conforme descrito a seguir.

#### 3.8.1 Ensaio de *pull-down* entre SmE16-His e soro de camundongo

Amostras de sangue de camundongo foram cedidas gentilmente pela Profa. Sheila Espírito Santo Araújo (LBCT/UENF). Inicialmente, para separar o soro, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3.500 rpm por 15 minutos. O soro obtido foi coletado e utilizado nos experimentos subsequentes.

Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de resina de Ni-NTA em microtubos de 1,5 mL. Para remover o álcool presente, a resina foi centrifugada a  $1.000 \times g$  por 1 minuto, a  $4^\circ\text{C}$ , e o sobrenadante foi descartado. Esse procedimento foi repetido após a adição de 400  $\mu\text{L}$  de água milliQ, seguida de centrifugação nas mesmas condições, sendo essa etapa realizada três vezes para remoção completa do álcool. Posteriormente, a resina foi equilibrada com tampão A, adicionando-se 400  $\mu\text{L}$  do tampão e centrifugando-se a  $1.000 \times g$  por 1 minuto, a  $4^\circ\text{C}$ . Essa etapa de equilíbrio foi repetida três vezes.

O experimento foi realizado nas condições controle (na ausência da proteína SmE16), apo (sem a presença de íons) e na presença da proteína com 2 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Na condição controle, o volume correspondente à proteína SmE16 foi substituído por tampão. Após o preparo da resina foram adicionados 7,5  $\mu\text{M}$  da proteína SmE16 em cada tubo nas condições apo e na presença de  $\text{CaCl}_2$ , e as amostras foram incubadas sob agitação orbital por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , permitindo a imobilização da proteína à resina de Ni-NTA. Em seguida, foi adicionado soro de camundongo às amostras. O soro foi previamente diluído em tampão A na proporção 1:1 (v/v). As amostras foram então incubadas sob agitação orbital a  $4^\circ\text{C}$  overnight. Após o período de incubação, a resina foi submetida a etapas de lavagem para remoção de proteínas ligadas de forma inespecífica. Inicialmente, foram realizadas lavagens com 500  $\mu\text{L}$  de tampão A seguidas de centrifugação a  $1.000 \times g$  por 1 minuto, a  $4^\circ\text{C}$ , com descarte do sobrenadante. Em seguida, foram realizadas duas lavagens adicionais com tampão contendo 10 mM de imidazol, utilizando 500  $\mu\text{L}$  em cada lavagem, sob as mesmas condições de centrifugação.

A eluição das proteínas ligadas foi realizada em duas etapas. Inicialmente, as proteínas foram eluídas com 500  $\mu\text{L}$  de tampão contendo 50 mM de imidazol, com incubação das amostras por 5 minutos sob agitação orbital, sendo o sobrenadante coletado. Em seguida, foi realizada a eluição final com 500  $\mu\text{L}$  de tampão contendo 500 mM de imidazol, também com incubação por 5 minutos sob agitação orbital. Após a eluição, foi adicionado tampão de amostra 4X (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,01% azul de bromofenol), seguido de aquecimento das amostras a  $95^\circ\text{C}$  por 5 minutos e centrifugação a  $1.000 \times g$  por 1 minuto. As frações eluídas foram posteriormente analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), permitindo a visualização das proteínas obtidas nos ensaios de *pull-down*.

### 3.8.2 Ensaio de *pull-down* entre SmE16-His e soro humano

O soro humano (plasma masculino AB) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich e aliqotado para utilização em experimentos posteriores. Para a realização dos ensaios de *pull-down*, foram seguidos os mesmos procedimentos previamente descritos para a preparação da resina de Ni-NTA e condições de preparo das amostras. O soro humano foi diluído na proporção 1:1 em tampão A e adicionado à resina contendo as amostras a serem testadas. As amostras foram incubadas sob agitação orbital a 4 °C overnight, possibilitando a associação de possíveis proteínas interagentes à proteína imobilizada. Em seguida, foram realizados os mesmos procedimentos de lavagem e eluição descritos anteriormente. Inicialmente, a fração correspondente ao material não retido à resina foi coletada. A resina foi submetida a etapas sucessivas de lavagem com tampão A sem adição de imidazol, seguido por duas lavagens com tampão contendo 5 mM de imidazol, duas lavagens com tampão contendo 10 mM de imidazol, duas lavagens com tampão contendo 20 mM de imidazol e uma lavagem final com tampão contendo 30 mM de imidazol, visando à remoção de proteínas ligadas de forma inespecífica.

Após as etapas de lavagem, as proteínas associadas à resina foram eluídas utilizando tampões contendo 500 mM de imidazol. As frações eluídas foram preparadas com tampão de amostra, aquecidas a 95 °C por 5 minutos e centrifugadas a 1.000 × g por 1 minuto. As amostras obtidas foram analisadas por SDS-PAGE (15%), permitindo a visualização das proteínas eluídas nos ensaios de *pull-down* com soro humano.

### 3.8.3 Ensaio de *pull-down* entre SmE16-His e extrato de macrófagos murinos

Foram cedidos, gentilmente, pela prof<sup>a</sup>. Thatiana Lopes Biá Ventura Simão (LBR/UENF), células de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7. As células foram submetidas à centrifugação 3,000 x g a 4°C por 5 minutos para retirar o excesso de PBS. Posteriormente, o pellet foi ressuspensionado por tampão de lise em concentração de 20 mM HEPES (pH 8,0); 10 NaCl; 0,5% de triton X100 e inibidor de protease (1X). A suspensão foi adicionada a um banho ultrassônico por 1 minuto em temperatura ambiente, em seguida foi incubada por 10 minutos a 4°C, sob agitação orbital. Após o período de incubação, o sobrenadante foi reservado para ser usado posteriormente.

Após o preparo da resina, conforme descrito na Seção 3.10.1, a proteína SmE16 foi incubada com a resina na concentração final de 7,6  $\mu$ M. Os ensaios foram realizados tanto na ausência quanto na presença de 2 mM de cálcio. Como controle experimental, foi utilizado apenas o extrato de macrófagos, incubado com a resina na ausência da proteína SmE16. As amostras foram incubadas overnight a 4°C, sob agitação orbital.

Após o período de incubação a resina foi submetida a etapas de lavagem utilizando tampão A e tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (5, 10, 20 e 30 mM), visando à remoção de interações inespecíficas. Após as lavagens, as proteínas associadas à resina foram eluídas com tampão contendo 500 mM de imidazol e o protocolo de eluição foi o mesmo descrito na seção 3.8.1.

#### 3.8.4 Ensaio de *pull-down* entre SmE16-GST e lisado de sangue de camundongo

Amostras de sangue de camundongo foram submetidas à lise celular por ressuspensão em tampão contendo 40 mM de HEPES (pH 8,0), 300 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 20% de glicerol e inibidor de proteases Complete, mine, EDTA-free da Roche na concentração 1x. A suspensão obtida foi submetida à sonicação, através de banho ultrassônico, por 1 minuto em temperatura ambiente seguida de incubação por 10 minutos a 4 °C sob agitação orbital. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 x g e o sobrenadante foi coletado e utilizado nos experimentos subsequentes.

Para os ensaios de *pull-down*, foram realizados os procedimentos de preparação da resina conforme descritos anteriormente. A proteína SmE16 foi clonada no vetor pGEX-4T-1, expressa em linhagem de *E. coli* BL21 e purificada por cromatografia de afinidade à glutationa, seguida por cromatografia de exclusão por tamanho. Como controle experimental, foi utilizada a proteína GST, obtida a partir do mesmo sistema de expressão. Tanto a proteína controle quanto a SmE16 foram incubadas com a resina na mesma concentração (6,7  $\mu$ M), seguindo o protocolo de incubação previamente descrito.

Após a incubação do lisado com a proteína imobilizada na resina, esta foi submetida a etapas sucessivas de lavagem para remoção de interações inespecíficas. As duas primeiras lavagens foram realizadas utilizando tampão A. A terceira lavagem foi realizada com tampão suplementado com 300 mM de NaCl, e a quarta lavagem foi realizada com tampão contendo 0,1% de Triton X-100.

Posteriormente, a eluição foi realizada conforme descrito anteriormente. As amostras eluídas foram analisadas por SDS-PAGE, 15%.

### **3.9 Análises por espectrometria de massas GeLC-MS/MS**

Os géis de SDS-PAGE foram inicialmente documentados por meio de registro de imagens, e as bandas de interesse foram recortadas e transferidas individualmente para microtubos de 1,5 mL previamente identificados. Em seguida, os fragmentos de gel foram submetidos à remoção do corante por incubação em solução de descoloração composta por 50 mM de bicarbonato de amônio e 50% de acetonitrila (ACN) sob agitação orbital em temperatura ambiente, overnight. Após a descoloração, os fragmentos de gel foram desidratados com ACN 100%, em duas incubações consecutivas de 1 minuto. A redução das pontes dissulfeto foi realizada através de incubação com solução contendo 10 mM de ditioneitol (DTT) em 100 mM de AmBic, a 55 °C por 30 minutos. Em seguida, a solução foi removida e os fragmentos foram novamente desidratados com ACN 100%.

Para a alquilação das cisteínas foi utilizado solução de 55 mM de iodoacetamida (IAA) em 100 mM de bicarbonato de amônio. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos em ambiente protegido da luz. Após essa etapa, os fragmentos passaram por nova desidratação com ACN 100%.

Por fim, foi realizada a digestão proteolítica através da adição de solução de tripsina preparada em 10 mM de bicarbonato de amônio e 10% de ACN. Considerando aproximadamente 50 µg de proteína por poço, realizamos a diluição da enzima (1 µg) na proporção 1:12. As amostras foram mantidas a 4 °C por cerca de 30 minutos para permitir a difusão da enzima no gel, sendo posteriormente incubadas a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

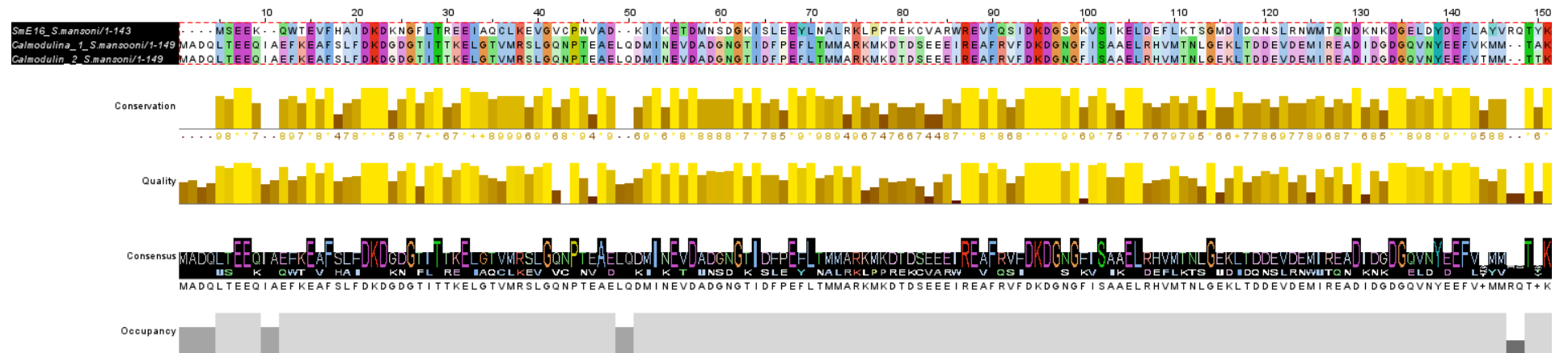
Após o período de digestão, os peptídeos foram extraídos por incubação dos fragmentos de gel em solução contendo 5% de ácido fórmico e 1:10 de ACN a 37 °C por 30 minutos. O sobrenadante contendo os peptídeos foi coletado e as amostras foram concentradas até secagem completa em concentrador a vácuo (SpeedVac) e armazenadas a -80 °C até a análise por espectrometria de massas. Antes da análise, os peptídeos secos foram ressuspensos em 50 µL de solução contendo 0,1% de ácido fórmico em 50 mM de bicarbonato de amônio.

Os experimentos foram conduzidos em colaboração com o Prof. Dr. Felipe Astolpho de Almeida (LQFPP-UENF).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Análise de bioinformática das sequências de aminoácidos da proteína SmE16 e proteínas EF-hand**

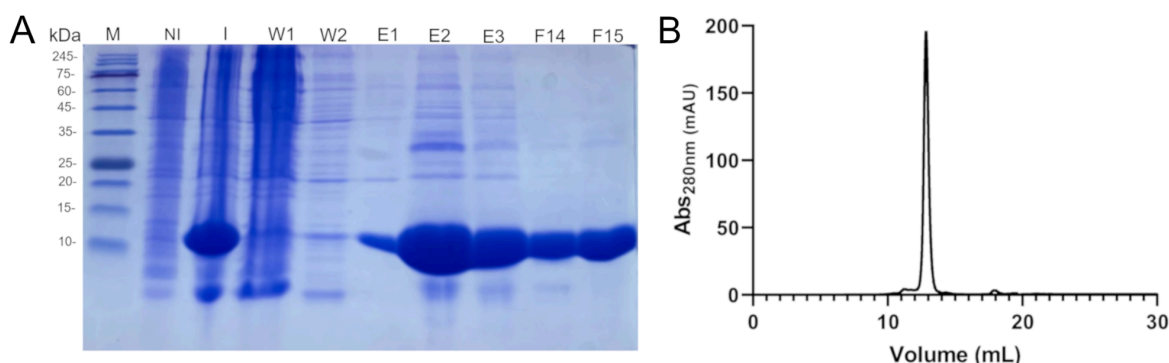
A comparação da proteína SmE16 com as calmodulinas de *Schistosoma mansoni* revelou a conservação de resíduos críticos envolvidos na ligação a íons cálcio. O alinhamento múltiplo evidenciou a presença de resíduos ácidos, principalmente ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu), localizados em posições correspondentes aos loops de coordenação dos motivos EF-hand (Figura 8). Esses resíduos são característicos de domínios EF-hand funcionais e estão diretamente associados à capacidade de coordenação do  $\text{Ca}^{2+}$  por interações eletrostáticas. Apesar da baixa identidade global entre as sequências, observou-se a preservação desses resíduos-chave ao longo do alinhamento, indicando a manutenção estrutural dos sítios de ligação ao cálcio.



**Figura 8: Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos da proteína SmE16 e das calmodulinas de *Schistosoma mansoni*.** O alinhamento evidencia a conservação de resíduos ácidos, como ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu), em posições correspondentes aos loops dos motivos EF-hand envolvidos na coordenação de íons  $Ca^{2+}$ .

## 4.2 Expressão e purificação da proteína SmE16 recombinante

A expressão da proteína SmE16 em sistema bacteriano através da *E.coli* foi realizada com sucesso, sendo detectada na fração solúvel após a indução da expressão, e a análise do gel SDS-PAGE revelou a presença de uma banda intensa com a massa molecular de aproximadamente 16 kDa, compatível com o tamanho esperado da proteína SmE16 recombinante (Figura 9-A). A purificação por cromatografia de afinidade através de resina Ni-NTA indicou que a proteína SmE16 foi retida na resina de forma eficiente permanecendo ausente ou em baixa quantidade nas frações de lavagens iniciais (W1-W2). Posteriormente, o perfil de eluição apresentou-se enriquecido da proteína interesse, porém ainda observamos a presença de contaminantes, sendo portanto necessário uma segunda etapa de purificação (Figura 9-A).



**Figura 9: Expressão e purificação da proteína SmE16.** (A) Análise das frações obtidas durante o processo de purificação por SDS-PAGE, incluindo células não induzidas (NI), e induzidas (I); Lavagens e eluições por cromatografia por afinidade Ni-NTA frações de lavagem (W1–W2) e frações eluídas (E1–E3); Segunda etapa de purificação por SEC demonstrando a presença da proteína recombinante na faixa de massa molecular (F14 e F15). (B) Perfil de eluição obtido por SEC, monitorado por absorvância a 280 nm, indicando a homogeneidade da proteína purificada.

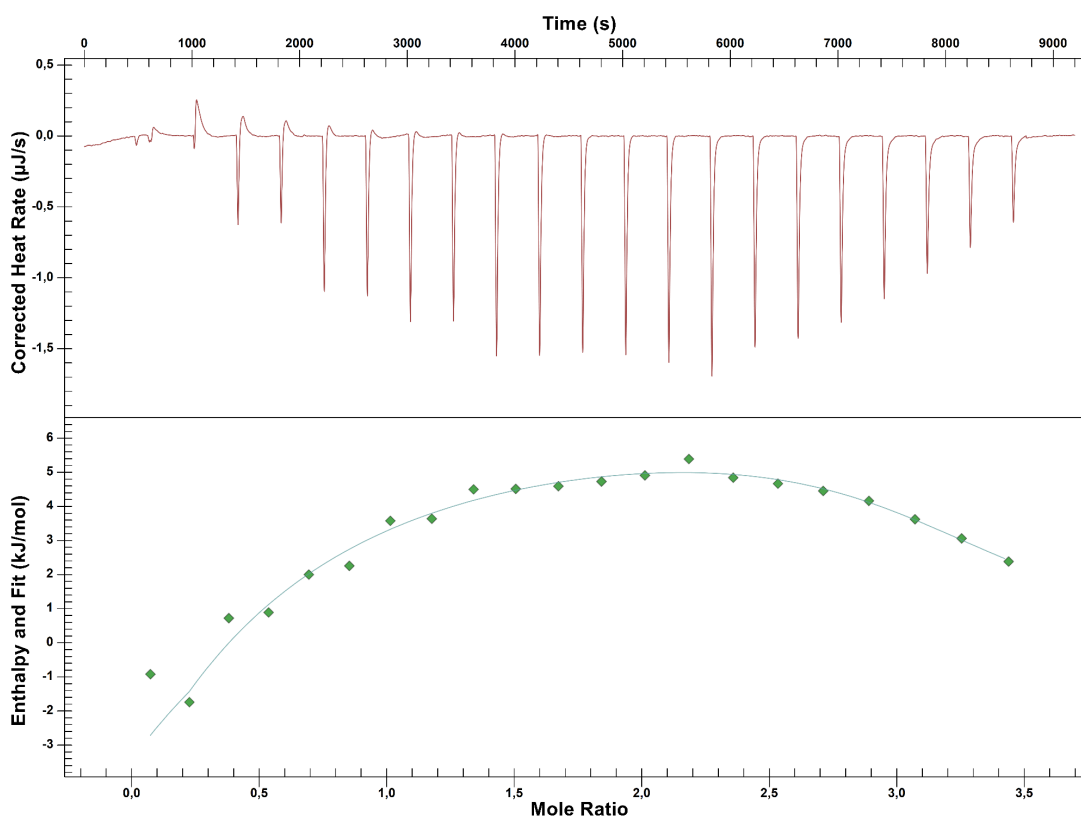
Foi realizada uma purificação adicional através da cromatografia por exclusão molecular, que resultou em frações com alta quantidade de proteína e alto nível de pureza conforme mostrado na Figura 19A. Além disso, o perfil cromatográfico monitorado pela absorvância em 280 nm é caracterizado por um pico bem definido, indicando que a fração correspondente apresenta uma proteína com alto nível de

pureza e homogênea, sendo, portanto, adequada para os estudos biofísicos posteriores (Figura 9-B).

#### **4.3 Investigação de ligação entre a proteína SmE16 e $\text{Ca}^{2+}$ e $\text{Mg}^{2+}$ por ITC**

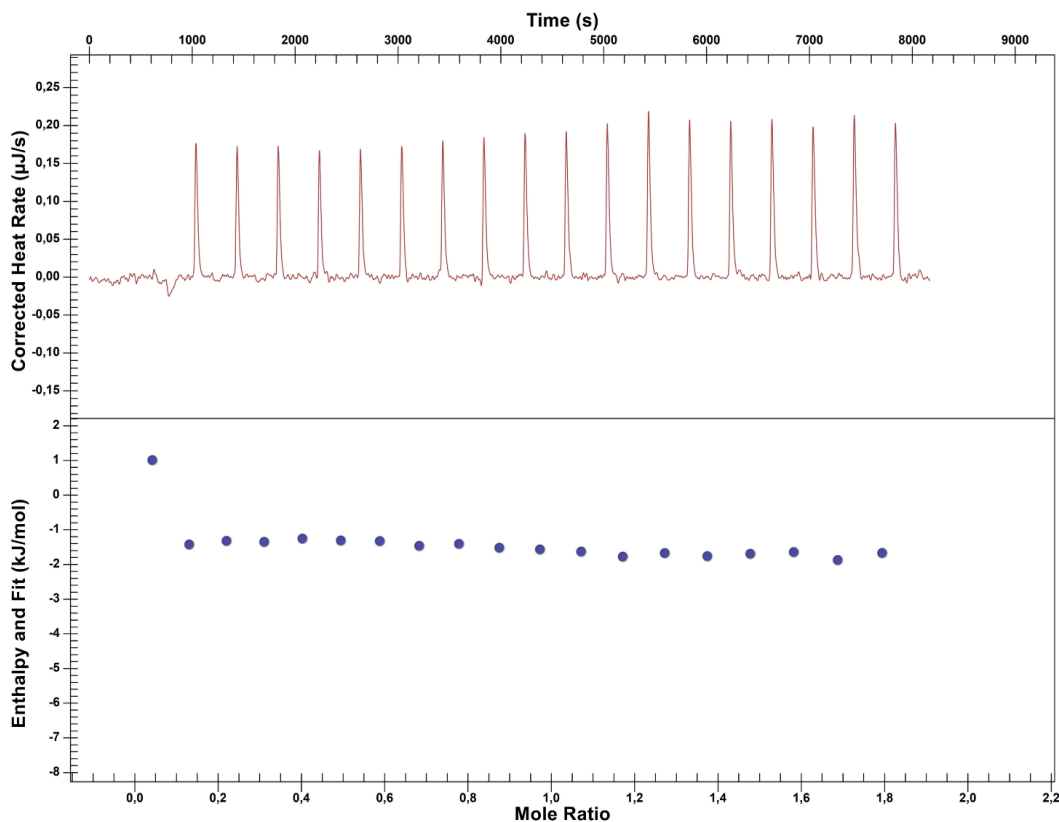
Realizamos experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) com o objetivo de avaliar a interação entre a proteína SmE16 e íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , a temperatura constante de 25 °C. As isotermas de ligação foram corrigidas posteriormente pelo calor de diluição do titulante.

Os resultados mostraram variação de calor associadas às injeções de cálcio, com sinais térmicos de diferentes magnitudes, ao longo do experimento. A integração dos picos de cada injeção, plotada em função da razão molar entre o ligante e a proteína, resultou em uma curva com tendências a saturação ao final da titulação, indicando a ocorrência de interação entre a proteína SmE16 e íons de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 10). Apesar dos dados experimentais serem ajustados a um modelo de ligação de múltiplos sítios, obtendo uma taxa de dissociação na faixa de micromolar ( $K_{d1} = 4.29 \mu\text{M}$  e  $K_{d2} = 15 \mu\text{M}$ ), não foi possível a determinação quantitativa confiável da afinidade de ligação devido ao alto erro associado ( $K_{a1} = (2,33 \pm 5,21) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ;  $K_{a2} = (6,81 \pm 8,00) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ).



**Figura 10: Isotherma da interação entre a proteína SmE16 e íons de  $\text{Ca}^{2+}$ .** O painel superior apresenta o termograma obtido após as sucessivas injeções do ligante na solução proteica. O painel inferior corresponde à isoterma de ligação resultante da integração dos picos indicando a interação específica entre SmE16 e íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

A titulação da SmE16 com íons de  $\text{Mg}^{2+}$  resultou em picos de calor com baixa amplitude mantendo ao longo das injeções, sem variação significativa de calor em função do aumento da razão molar entre a proteína e o ligante (Figura 11). A integração desses picos resultou em uma isoterma aproximadamente linear, indicando que, nas condições experimentais avaliadas, não foi detectada interação mensurável entre a proteína e o  $\text{Mg}^{2+}$ .



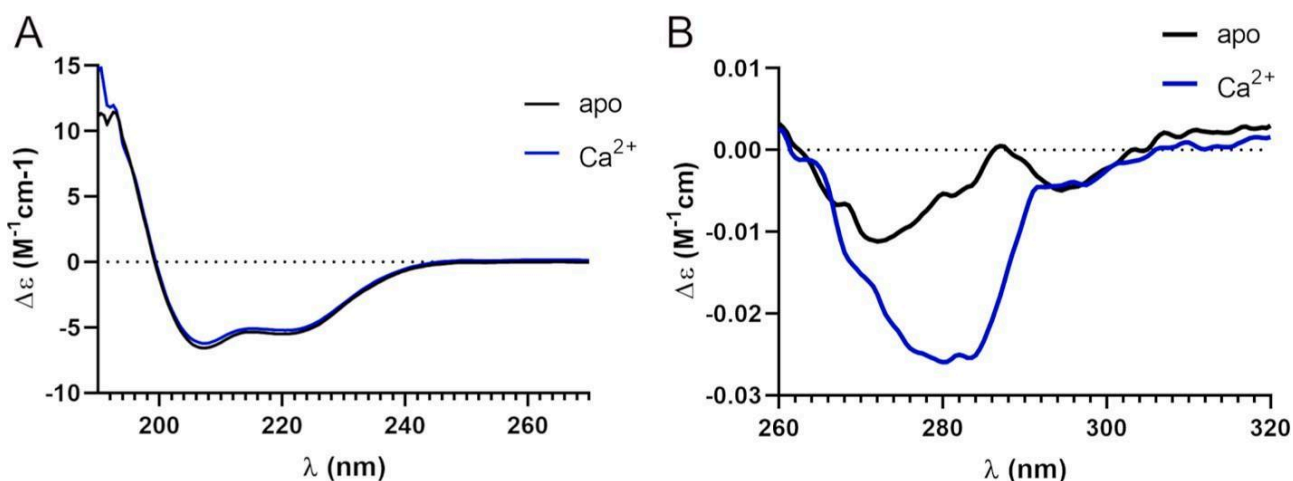
**Figura 11: Isoterma da interação entre a proteína SmE16 e íons de  $Mg^{2+}$ .** O painel superior apresenta o termograma obtido após as sucessivas injeções do ligante na solução proteica. O painel inferior corresponde à isoterma de ligação resultante da integração dos picos indicando que não ocorre interação mensurável entre a SmE16 e íons  $Mg^{2+}$ . Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

#### 4.4 Avaliação do estado conformacional através de CD

Para avaliar características estruturais da proteína SmE16, na presença e ausência de cálcio, foram realizados experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular em duas faixas do espectro, as regiões Far-UV e Near-CD.

Os resultados obtidos na região Far-UV na condição apo mostraram que a proteína SmE16 apresentou sinais característicos de proteínas que contém conteúdo significativo de estrutura secundária organizada, com mínimos típicos associados a estruturas  $\alpha$ -helicoidais, conforme esperado em proteínas contendo motivos EF-hand (Figura 12-A). Além disso, o espectro de CD da proteína na presença de íons  $Ca^{2+}$  manteve o perfil estrutural observado na condição apo, sem diferenças significativas.

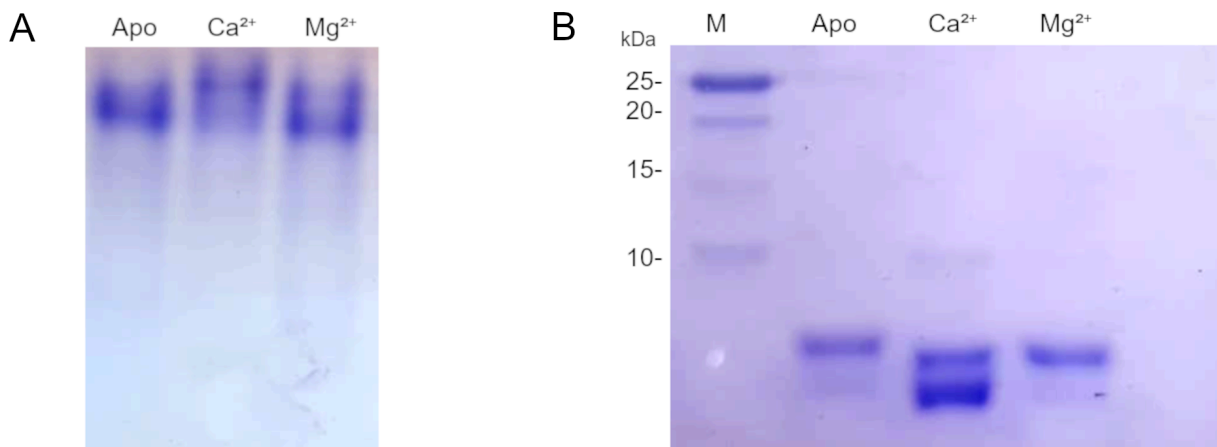
Em contrapartida, os espectros obtidos na região Near-CD indicaram que, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , a proteína sofre significativa mudança espectral, pela alteração no ambiente dos resíduos aromáticos da proteína, evidenciando mudança conformacional da estrutura terciária da proteína (Figura 12-B)



**Figura 12: Espectros de dicroísmo circular (CD) da proteína SmE16 na ausência e presença de  $\text{Ca}^{2+}$ .** (A) Espectros de dicroísmo circular na região do Far-UV, obtidos com SmE16 (5  $\mu\text{M}$ ) na ausência (preto) e presença (azul) de  $\text{CaCl}_2$  (2 mM), demonstrando que a ligação do cálcio não promove alterações significativas na estrutura secundária da proteína. (B) Espectros de dicroísmo circular na região do Near-UV, registrados com SmE16 (288  $\mu\text{M}$ ) na ausência (preto) e presença (azul) de  $\text{CaCl}_2$  (2 mM), nos quais a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  resulta em mudanças significativas no sinal, indicando uma reorganização conformacional da estrutura terciária. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

#### 4.5 Avaliação de mudanças conformacionais por eletroforese de poliacrilamida nativa e por digestão branda com tripsina

Os resultados da eletroforese sob condições nativas demonstraram que a SmE16 na forma apresentada alteração no padrão de migração eletroforética, na presença de íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , evidenciada pela mudança na mobilidade da banda em comparação à condição apo. Em contrapartida, a proteína incubada com íons  $\text{Mg}^{2+}$  não resultou em alterações no padrão de migração em comparação com a condição apo (Figura 13-A). A diferença de mobilidade da proteína SmE16 na presença de cálcio sugere mudança conformacional na presença deste íon.



**Figura 13: Alterações conformacionais da proteína SmE16 (40  $\mu$ M) induzidas pela ligação de cálcio.** (A) A eletroforese em gel nativo revela um deslocamento de mobilidade na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM), indicando mudança conformacional, efeito não observado na presença de  $\text{Mg}^{2+}$  (2 mM). (B) SDS-PAGE mediante a digestão branda com tripsina demonstra diferença no perfil proteolítico após a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) refletindo modificações na acessibilidade dos sítios de clivagem e confirmando alterações conformacionais específicas induzidas pelo íon, o mesmo não observado na presença de  $\text{Mg}^{2+}$  (2 mM). Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

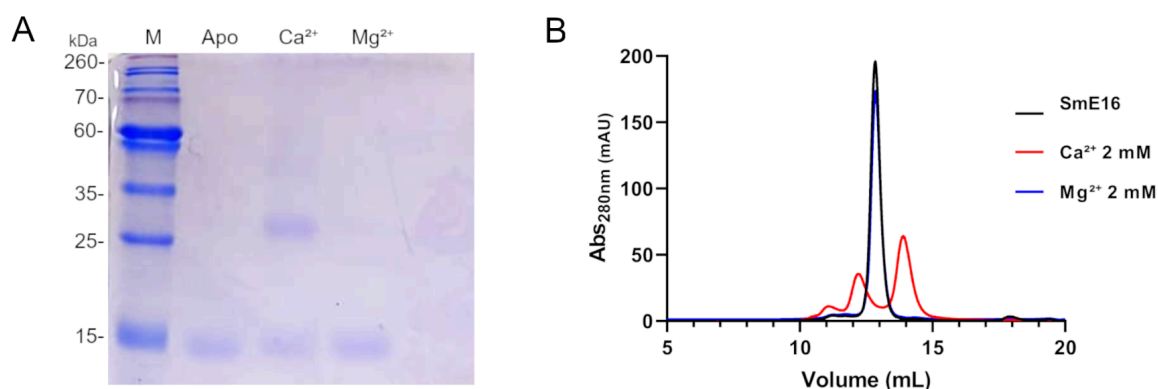
Os resultados da digestão branda com tripsina indicaram que na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  a proteína apresentou diferença no padrão de fragmentação do produto da digestão, quando comparado com a condição apo, evidenciadas pela variação da intensidade e quantidade de fragmentos observados. Por outro lado, a digestão da proteína na presença de íons  $\text{Mg}^{2+}$  resultou em um perfil de fragmentos semelhantes à condição apo (Figura 13-B).

#### 4.6 Avaliação do estado oligomérico da proteína SmE16 na presença de $\text{Ca}^{2+}$ e $\text{Mg}^{2+}$

Para investigar se a ligação da proteína SmE16 a  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  promove alterações em seu estado oligomérico, foram realizados ensaios de crosslinking químico e cromatografia por exclusão molecular (SEC), comparando-se as condições apo e na presença desses íons.

Análises por SDS-PAGE indicaram que na condição apo, a proteína SmE16 corresponde à forma monomérica, assim como na condição em que a proteína se encontra na presença de íons  $\text{Mg}^{2+}$ . Entretanto, quando a proteína se encontra na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , foi possível detectar a presença de uma banda adicional,

contendo o dobro da massa molecular em relação ao monômero, indicando a formação de dímero de SmE16 induzido por cálcio (Figura 14-A).



**Figura 14: Dimerização parcial de SmE16 (40  $\mu$ M) induzida por cálcio.** (A) O crosslinking químico evidencia a formação de dímeros na presença de Ca<sup>2+</sup> (2 mM), não observada na ausência do íon ou com Mg<sup>2+</sup> (2 mM). (B) A cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) mostra que SmE16 na forma apo e incubada com Mg<sup>2+</sup> elui como monômero, enquanto a adição de Ca<sup>2+</sup> promove o surgimento de espécies de maior massa molecular, indicando oligomerização induzida por cálcio. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

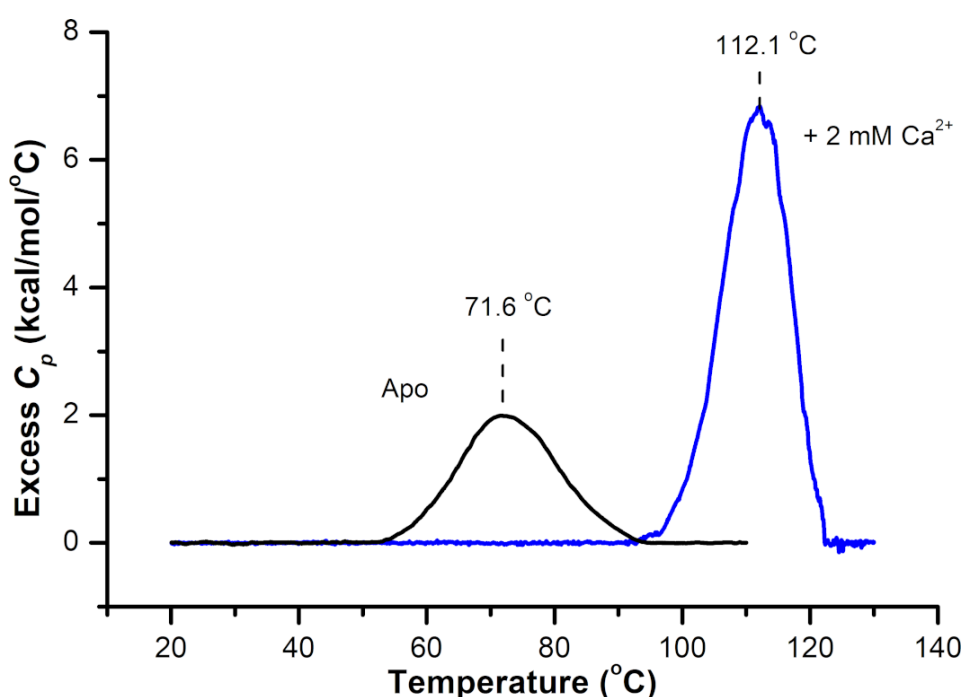
O resultado do experimento de SEC da SmE16 na condição apo mostrou um perfil cromatográfico caracterizado por um pico principal bem definido, compatível com uma proteína predominantemente homogênea (Figura 14-B). Na presença de Mg<sup>2+</sup>, o perfil de eluição da SmE16 foi semelhante ao observado na condição apo, sem alterações significativas no volume de eluição ou na forma do pico principal. Entretanto, a incubação da proteína SmE16 com íons de cálcio resultou em mudança significativa no perfil cromatográfico caracterizado pelo aparecimento de picos adicionais e alteração na distribuição da proteína ao longo do volume de eluição (Figura 14-B).

#### 4.7 Avaliação da estabilidade térmica da proteína através de ensaios de DSC

A estabilidade térmica da proteína SmE16 foi investigada através da calorimetria de titulação isotérmica (DSC), visando avaliar o efeito da ligação ao cálcio sobre o comportamento térmico da proteína.

Os resultados obtidos revelaram que tanto na condição apo quanto na condição com cálcio, a proteína SmE16 obteve um perfil de transição térmica bem definido (Figura 15). Em ambas as condições, a transição foi caracterizada por um aumento da capacidade calorífica ( $c_p$ ) em função da temperatura, evidenciados pela presença de picos positivos, indicando processo endotérmico.

Na condição apo, a proteína SmE16 apresentou transição térmica ( $T_m$ ) de  $72,3, \pm 0,7$  °C. Entretanto, quando a proteína está na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , foi observado um deslocamento significativo na transição térmica, com um  $T_m$  de  $112,8 \pm 0,7$  °C (Figura 15).



**Figura 15: Perfil calorimétrico da proteína SmE16 e  $\text{Ca}^{2+}$  (2mM) por DSC.** A proteína SmE16 na forma apo (linha preta) apresenta transição térmica em 71,6 °C, enquanto na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre deslocamento do pico para 112,1 °C, indicando aumento significativo da estabilidade térmica induzida pela ligação ao cálcio. O eixo Y representa a capacidade calorífica excessiva em função da temperatura. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

**Tabela 1. Parâmetros termodinâmicos associados à desnaturação térmica da proteína SmE16.**

	APO	Ca <sup>2+</sup>
T <sub>m</sub> (°C)	72.3 ± 0.7	112.8 ± 0.7
ΔH <sub>cal</sub> (kcal/mol)	42 ± 3	79 ± 4
ΔT <sup>1/2</sup> (°C)	19 ± 1	12.0 ± 0.5
ΔC <sub>p,max</sub> (kcal/mol/°C)	2.0 ± 0.1	6.4 ± 0.4

**Nota:** A partir das análises do termograma de DSC foram obtidos, a temperatura de melting (T<sub>m</sub>), entalpia calorimétrica (ΔH<sub>cal</sub>), largura de det transição a meia-altura ΔT<sup>1/2</sup> (°C), capacidade máxima calorífica (ΔC<sub>p,max</sub>). Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

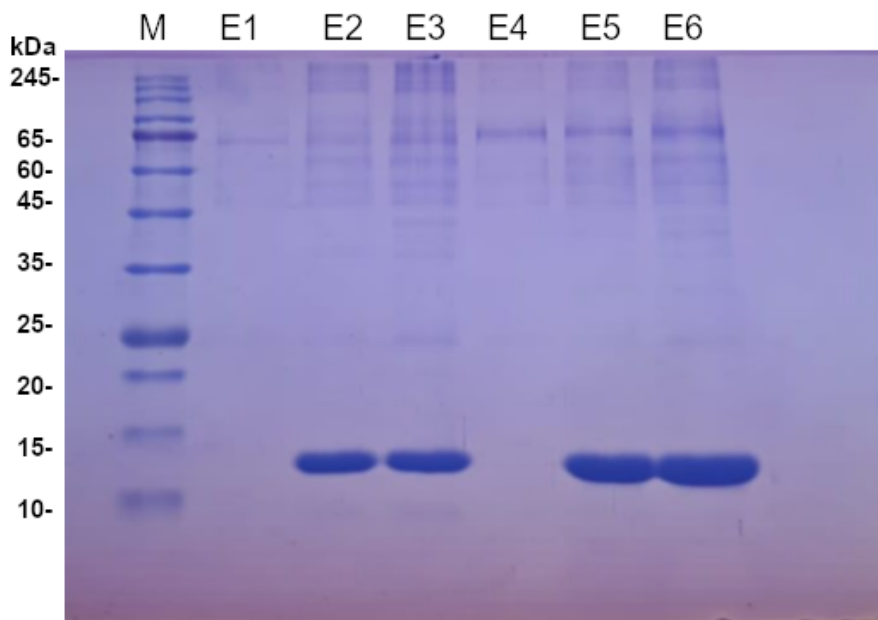
Após a integração da área sob o pico de transição foi possível obter a entalpia calorimétrica (ΔH<sub>cal</sub>), que apresentou valores positivos para ambas condições sendo de 42 ± 3 kcal/mol para a forma apo e de 79 ± 4 kcal/mol na presença de Ca<sup>2+</sup>, indicando um processo endotérmico (Tabela 1). A redução do ΔT<sup>1/2</sup> (°C) de 19 ± 1 na forma apo para 12.0 ± 0.5 na presença de Ca<sup>2+</sup>, indica que o desenovelamento térmico da proteína SmE16 ocorre de forma mais cooperativa quando associada ao cálcio. Além disso, o aumento da ΔC<sub>p,max</sub> para 6.4 ± 0.4 na presença de Ca<sup>2+</sup> sugere mudanças conformacionais da proteína SmE16 na presença deste íon (Tabela 1).

#### **4.8 Identificação de potenciais parceiros proteicos entre a proteínas SmE16 e proteínas do hospedeiro vertebrado**

Ensaio de *pull-down* foram realizados com o objetivo de avaliar a capacidade da proteína SmE16 de interagir com proteínas presentes em diferentes amostras biológicas de hospedeiros murino e humano.

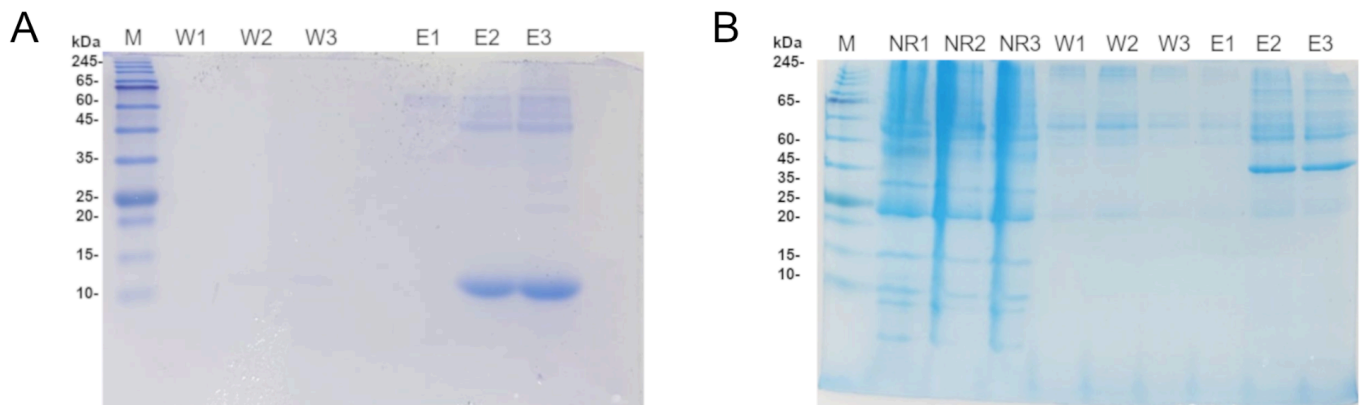
Os resultados do *pull-down* com soro de camundongo revelaram a presença de proteínas do hospedeiro nas amostras eluídas. Interessantemente, na condição experimental realizada na presença de cálcio, observou-se um perfil de bandas mais

abundante em comparação às amostras na ausência desse íon (Figura 16). Foram detectadas bandas de diferentes massas moleculares que não foram detectadas na condição de controle negativo, realizada apenas na presença de proteínas do soro.



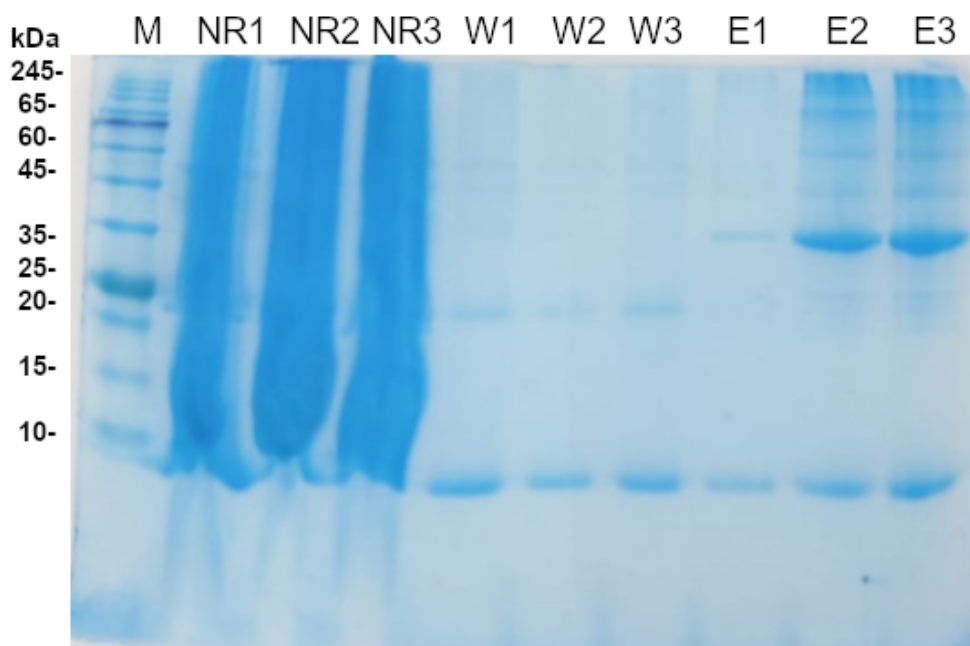
**Figura 16: Pull-down da proteína SmE16 com soro de camundongo.** As eluições foram realizadas com 50 mM de imidazol (E1–E3) e 500 mM de imidazol (E4–E6). As eluições seguem a mesma ordem experimental: controle, SmE16 na forma apo e SmE16 na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Para os ensaios de *pull-down* com soro humano utilizamos a proteína SmE16 fusionada com His-tag e GST-tag como iscas. Ambas as condições experimentais mostraram padrão de bandas semelhantes, apresentando múltiplas proteínas do hospedeiro sendo eluídas, dentre elas, foram detectadas bandas intensas, principalmente na proteína contendo a His-tag (Figura 17-A). Em relação aos controles, a amostra de soro incubada com a resina de Ni-NTA apresentou um perfil eletroforético mais limpo, possuindo menor quantidade de interações inespecíficas, em relação à resina de GSH (18-B). Além disso, foi possível observar que ambas condições apresentaram, em reação as amostras apo e de  $\text{Ca}^{2+}$ , um perfil de bandas semelhante, portanto, sem alterações como nas amostras anterior.



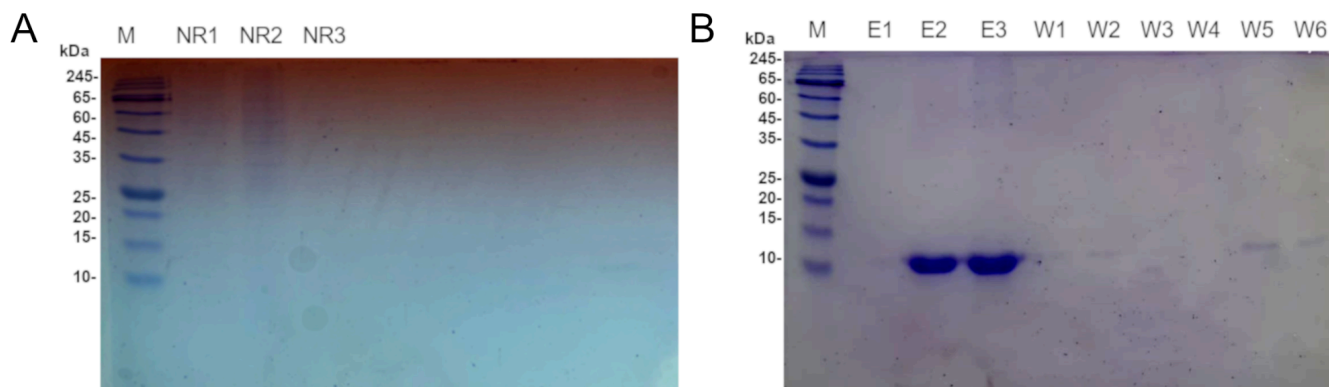
**Figura 17: Pull-down da proteína SmE16 com soro de humano.** (A) Pull-down da proteína SmE16-His. W1–W3 correspondem às lavagens e E1–E3 às eluições. (B) Pull-down da proteína SmE16-GST. NR1–NR3 correspondem às amostras não retidas, W1–W3 às lavagens e E1–E3 às eluições. Em ambos os experimentos, as lavagens e as eluições seguem a mesma ordem experimental: controle, SmE16 (apo) e SmE16 na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Assim como nos experimentos anteriores, o *pull-down* realizado com lisado de células do sangue do camundongo utilizando SmE16-GST, apresentou a presença de diferentes bandas correspondente à proteína do hospedeiro, com um padrão de bandas semelhante tanto nas condições apo quanto com  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 18). O controle contendo apenas a proteína GST na presença do lisado de células mostraram um perfil eletroforético relativamente limpo, com um número reduzido de bandas detectadas.



**Figura 18:** *Pull-down* da proteína SmE16-GST utilizando lisado de sangue de camundongo. As frações NR1–NR3 correspondem às amostras não retidas, W1–W3 às lavagens e E1–E3 às eluições. Todas as frações seguem a mesma ordem experimental: controle, SmE16 (apo) e SmE16 na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Por fim, foi realizado o *pull-down* com extrato celular de macrófagos murinos e os resultados mostraram redução considerável de bandas correspondentes a proteínas do hospedeiro apresentando poucas bandas com baixa intensidade, principalmente, na condição com  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 19-B). Embora a baixa quantidade de células possa ter influenciado esse resultado, as análises por espectrometria de massas das frações obtidas ainda estão pendentes, o que impedirá, no momento, a identificação das proteínas envolvidas. A análise das frações não retidas demonstrou que a amostra apo apresentou maior quantidade de proteínas quando comparadas com a condição com  $\text{Ca}^{2+}$ , indicando menor retenção de proteínas nessa condição experimental (Figura 19-A).



**Figura 19: Pull-down da proteína SmE16-His utilizando extrato de células de macrófagos murinos.** A) As frações NR1–NR3 correspondem às amostras não retidas. B) E1–E3 às eluições. W1–W6 às lavagens. Todas as frações seguem a mesma ordem experimental: controle, SmE16 (apo) e SmE16 na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ .

As bandas obtidas nos ensaios de *pull-down* foram recortadas e submetidas à identificação por espectrometria de massas. O conjunto de proteínas foi identificado após a aplicação de critérios de filtragem, excluindo proteínas presentes nas amostras controle, proteínas com baixo score e contaminantes. Além disso, isoformas e fragmentos correspondentes a uma mesma proteína foram agrupados, a fim de evitar redundância na identificação.

As análises proteômicas das amostras pertencentes ao hospedeiro murino mostraram a presença de proteínas associadas ao sistema imunológico, proteínas séricas e proteínas associadas ao metabolismo lipídico, conforme apresentado na Tabela 2. Dentre as proteínas identificadas, destaca-se a apolipoproteína A-IV (APOA4), detectada em todas as condições experimentais realizadas, indicando alta reprodutibilidade entre os experimentos. Também foram observadas outras apolipoproteínas, como apolipoproteína A-I (APOAI) e apolipoproteína E (APOE), porém em menor confiança, sendo observadas principalmente nas condições contendo cálcio. A mannose-binding protein A (MBL1) foi identificada exclusivamente nas condições contendo cálcio, assim como as proteínas carboxipeptidase N (CPN1) e paraoxonase 1 (PON1), sugerindo possível dependência do íon para sua detecção (Tabela 2). Esse padrão está de acordo com

com a análise em gel, na qual as amostras contendo cálcio apresentaram maior número de bandas (Figura 16). Além disso, foi identificada a proteína alpha-1-antitrypsin (SERPINA1) apenas nas condições APO+Ca<sup>2+</sup> nas amostras de soro murino, não sendo detectada nas demais condições experimentais, o que demonstra baixa recorrência nessas condições. Entretanto, posteriormente, essa proteína foi identificada de forma consistente nas análises de soro humano, indicando maior relevância nesse contexto experimental (Tabela 3).

**Tabela 2. Proteínas identificadas nas diferentes condições experimentais do soro murino após filtração e agrupamento**

Proteína	Gene	APO	Ca <sup>2+</sup>	APO+Ca <sup>2+</sup>	APO+Ca <sup>2+</sup>	Confiança
Apolipoprotein A-IV	Apoa4	+	+	+	+	Alta
Apolipoprotein A-I	Apoa1	-	+	+	-	Moderada
Mannose-binding protein A	Mbl1	-	+	-	+	Moderada
Apolipoprotein E	ApoE	-	+	-	+	Moderada
Carboxypeptidase N	Cpn1	-	+	-	-	Baixa
Paraoxonase 1	Pon1	-	+	-	-	Baixa
Alpha-1-antitrypsin	Serpina1	-	-	+	-	Baixa

**Nota:** +: presença da proteína; -: ausência da proteína. A classificação de confiança foi atribuída com base na consistência de identificação entre as condições experimentais, considerando a recorrência das proteínas identificadas.

Análises proteômicas das amostras do soro humano mostraram a presença enriquecida das proteínas alpha-1-antitrypsin (SERPINA1) e a vitronectina (VTN), identificadas em quase todas as condições experimentais analisadas (Tabela 3). A identificação de múltiplos identificadores associados à SERPINA1, evidenciadas pelos elevados scores de identificação, número de peptídeos únicos e cobertura da

sequência observada (Apêndice B) indica a presença de diferentes isoformas ou fragmentos dessas proteínas e evidência a reprodutibilidade dos dados obtidos nesta análise proteômica. A apolipoproteína A-I (APOA1) foi identificada em três condições experimentais diferentes avaliadas no soro humano, evidenciando um padrão de detecção de forma recorrente. Além disso, essa proteína também foi identificada nas amostras de soro murino, indicando sua presença nos diferentes organismos analisados neste estudo (Tabela 2).

No geral, os dados obtidos evidenciaram um padrão de proteínas séricas com alta abundância, sendo destacadas aquelas identificadas de forma recorrente entre as diferentes condições experimentais e entre os organismos analisados, demonstrando um padrão reprodutível de interações proteicas das amostras avaliadas. Além disso, é importante destacar que as amostras provenientes de lisado de sangue murino não apresentaram qualidade adequada ou não foram identificadas proteínas interagentes nas condições avaliadas. Dessa forma, os resultados obtidos por espectrometria de massas neste estudos devem ser considerados preliminares, refletindo as condições experimentais avaliadas.

**Tabela 3. Proteínas identificadas nas diferentes condições experimentais do soro humano após filtragem e agrupamento**

Proteína	Gene	APO+Ca <sup>2+</sup> (His-tag)	APO (His-tag)	Ca <sup>2+</sup> (His-tag)	APO (GST-tag)	Ca <sup>2+</sup> (GST-tag)	Confiança
Alpha-1-antitrypsin	Serpina1	+	+	-	+	+	Alta
Vitronectin	Vtn	+	+	+	+	+	Alta
Apolipoprotein A-I	Apoa1	+	-	-	+	+	Moderada

**Nota:** +: presença da proteína; -: ausência da proteína. A classificação de confiança foi atribuída com base na consistência de identificação entre as condições experimentais, considerando a recorrência das proteínas identificadas.

As tabelas apresentadas nesta seção correspondem às proteínas mais relevantes identificadas após a aplicação dos critérios de filtragem. As listas completas das proteínas identificadas em cada condição experimental e os parâmetros detalhados da identificação proteica se encontram organizadas nos Apêndices de A e B.

## 5. DISCUSSÃO

Apesar de a esquistossomose ser uma doença que apresenta dados alarmantes, afetando grande parte da população mundial, ela ainda permanece como um problema persistente de saúde pública e social em países em desenvolvimento (WHO, 2023; Li *et al.*, 2025). Por se tratar de uma doença tropical negligenciada que historicamente não é priorizada por políticas públicas e investimentos por setores privados por afetar principalmente populações em situação de vulnerabilidade socioeconômica (Li *et al.*, 2025; Feasey *et al.*, 2009). A negligência contribui para a persistência em regiões em que as condições estruturais são desfavoráveis, principalmente em regiões caracterizadas pela falta de saneamento básico e acesso limitado à água potável, condições que favorecem a manutenção do ciclo de transmissão do (Anouk *et al.* 2022; Immurana *et al.*, 2024).

Em áreas endêmicas, o uso cotidiano de recursos naturais como rios, lagoas ou outros corpos d'água para atividades como banho, lazer, lavar roupas sujas é uma prática comum, principalmente, entre crianças e famílias que não possuem abastecimento de água de forma adequada (EKPO *et al.* 2012; Gryseels, 2006; Colley, 2014). Essas atividades favorecem de forma significativa o aumento de risco de exposição às cercárias, forma infectante do parasito, contribuindo para o aumento da taxa de infecção nessas comunidades. Além disso, a exposição contínua à água contaminada pode favorecer o aumento de reinfecção, mesmo em indivíduos que foram previamente tratados. Atualmente, o único medicamento recomendado para o uso em larga escala contra a esquistossomose é o praziquantel (Marchat *et al.* 2020). O medicamento tem sido utilizado com sucesso nos últimos 30 anos, entretanto, seu mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido. A dependência de um único medicamento representa um importante desafio para o controle da doença pois o surgimento de resistência poderia comprometer de forma significativa as populações que já se encontram em situação de vulnerabilidade (Moore *et al.* 2024). Embora na maioria dos casos a doença não seja fatal, sua

evolução crônica causa comorbidade em indivíduos infectados, impactando sua qualidade de vida, produtividade, cognição, contribuindo para o ciclo de pobreza e desigualdade social em países ainda em desenvolvimento. Neste cenário, a busca por novas alternativas de intervenções se tornam relevantes reforçando a importância de estudos para adquirir conhecimento sobre a relação da interação entre o parasita e o hospedeiro.

Os íons de cálcio são os principais sinalizadores das células em diferentes organismos, atuando em processos biológicos essenciais para a manutenção da vida como na movimentação, contração e sinalização. (Zheng *et al*, 2015; Berridge *et al.*, 1998). Entretanto, o íon não atua de forma isolada pois depende da interação com proteínas ligantes a cálcio que irão reconhecer variação de concentração do íon e traduzir em respostas celulares (Clapham, 2007). A manutenção da homeostase de  $Ca^{2+}$  é de suma importância para a regulação da progressão do ciclo celular uma vez que a desestabilização pode ocasionar a disfunção das células de forma significativa (Patergnani *et al.*, 2020), portanto, compreender os mecanismos de funcionamento dessas proteínas são relevantes na busca por novas abordagens de intervenções.

A proteína estudada neste presente trabalho, a SmE16 de *Schistosoma mansoni*, é uma proteína ainda enigmática na literatura tendo sua função ainda pouco estabelecida, entretanto, é uma proteína que possui domínios de interação ao cálcio, sugerindo seu envolvimento em processos dependentes desse íon e apesar de ser descrito anteriormente como uma proteína específica de ovos do *Schistosoma* (Moser *et. al.*, 1992), atualmente sabe-se que ela está presente em outras diferentes estágios do ciclo, incluindo em machos e fêmeas imaturas, que não apresentam a produção de ovos (Figura 5). Além disso, estudos mostraram a presença de transcritos da proteína no conteúdo regurgitado do verme, indicando que a SmE16 é uma proteína secretada e que está presente na interface parasito-hospedeiro (Hall *et. al.*, 2011). Esses achados evidenciam a importância de compreender o potencial papel dessa proteína, reforçando a sua relevância biológica. Até então, os dados disponíveis na literatura eram estudos de proteômica e transcriptômica em larga escala, sem estudos experimentais direcionados a sua caracterização funcional. Nesse contexto, a caracterização biofísica previamente publicada contribuiu para a atualização do conhecimento sobre essa proteína

Proteínas pertencentes à família das EF-hand são reconhecidas pela sua composição estrutural típica composta por duas  $\alpha$ -hélice ligadas por um loop responsável pela quelação de íons de  $\text{Ca}^{2+}$ . São reconhecidas pela sua capacidade de atuarem como sensores intracelulares, traduzindo variações de concentração desse íon em respostas celulares (Gifford, 2007a). Para avaliar potenciais características funcionais da proteína SmE16, comparando sua sequência primária com a de proteínas em que a função e estrutura já bem estabelecidas na literatura, foi realizado alinhamento múltiplo com proteínas pertencentes a diferentes helmintos.

A conservação de resíduos críticos na coordenação de íons de cálcio, Glu e Asp, é uma das principais características de proteínas pertencentes à família EF-hand. Esses aminoácidos apresentam carga negativa, favorecendo interações eletrostáticas com íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , essencial para a função de proteínas que atuam como sensores celulares. Portanto, a presença desses resíduos conservados entre a SmE16 e as calmodulinas do verme sugere a manutenção de mecanismos funcionais relacionados à interação ao cálcio (Figura 8). A conservação desses resíduos, mesmo na presença de baixa identidade global, é comum ao que está descrito na literatura, demonstrando que a funcionalidade de domínios EF-hand está mais relacionada à preservação desses resíduos, do que a similaridade total da sequência.

No entanto, análises baseadas em alinhamento de sequência representam evidências iniciais e não suficientes para confirmar a função de uma proteína, sendo necessárias abordagens experimentais para validação. Nesse contexto, os dados de caracterização biofísica apresentados no presente trabalho fornecem suporte experimental para à interpretação funcional sugerida pela análise da sequência.

A calorimetria de titulação isotérmica é uma técnica amplamente utilizada capaz de medir o calor liberado ou absorvido durante uma reação. Uma das principais características dessa técnica é a sua capacidade de detectar pequenas variações de calor devido a sua alta sensibilidade fornecendo informações termodinâmicas associadas ao processo (Johnson,2021; Grolier *et. al.* 2012). No presente trabalho, a análise dos experimentos de ITC revelou que na presença de cálcio a SmE16 possui um perfil calorimétrico complexo, sendo caracterizado pela presença de componentes endotérmico e exotérmico ao longo da titulação (Figura

9). Esse comportamento sugere que durante a reação ocorrem múltiplos processos contribuindo para o calor observado, demonstrando que nesse sistema ocorre mais do que um simples evento de ligação (Guerrero *et al.*, 2025; Freire, 2009)

Esse perfil calorimétrico em proteínas ligantes a cálcio indica que, além da ligação ao íon, a proteína sofre mudanças conformacionais significativas após a interação. Os dados de dicróismo circular indicaram que quando a proteína SmE16 liga cálcio promove alterações estruturais na estrutura terciária da proteína, associada a modificações no ambiente dos resíduos aromáticos (Figura 12) (Kelly *et al.* 2005; Greenfield, 2006). Os experimentos de digestão branda da proteína com tripsina reforçam a ideia que a interação ao cálcio promove mudanças conformacionais, uma vez que na presença de cálcio o padrão de bandas do produto da digestão é distinto em relação a amostra apo, indicando uma mudança de padrão dos sítios de clivagem da tripsina (Figura 13-B) (Leene *et al.*, 2025; Schopper *et al.*, 2017).

Modificações na estrutura terciária podem impactar de forma significativa na capacidade de interação com monômero, influenciando no estado oligomérico da proteína, resultado observado nos experimentos de crosslinking químico (Figura 16) (Marsh e Teichmann, 2014). Cada processo sofrido pela proteína ao interagir com cálcio possui individualmente o seu calor associado, portanto, contribuindo de forma combinada para o sinal detectado no ITC.

Dessa forma, devido ao elevado nível de incerteza associado ao perfil calorimétrico observado, não foi possível realizar o fitting confiável dos dados aos modelos termodinâmicos disponibilizados (Tellinghuisen, 2008; Turnbull e Daranas, 2003). Entretanto, a magnitude do sinal de calor observado nos permite inferir que a interação da proteína SmE16 com cálcio ocorre na faixa micromolar, valor compatível com as afinidades descritas na literatura para proteínas ligantes a cálcio (Vallone *et al.*, 2016, Penumutchu *et al.* 2014). Em contrapartida, na titulação com íons de  $Mg^{2+}$  foi observado apenas calor atribuído a diluição do ligante no tampão, indicando ausência de interação com a proteína SmE16 (Figura 11), nas condições experimentais avaliadas, reforçando a especificidade de interação da proteína com o cálcio, comportamento conforme descrito na literatura cujo os sítios de ligação ao  $Ca^{2+}$  apresentam afinidade maior (Schwaller, 2020; Gifford *et al.*, 2007b).

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica amplamente utilizada em estudos que busca elucidar propriedades termodinâmica e estabilidade de proteínas, através da determinação de parâmetros como temperatura de transição térmica ( $T_m$ ), variação da entalpia ( $\Delta H$ ) e variação da capacidade calorífica ( $\Delta C_p$ ) (Kuril, 2024).

Os resultados DSC indicaram aumento significativo na estabilidade térmica da proteína SmE16 na presença de íons de cálcio. Na presença de cálcio o  $T_m$  da proteína foi aproximadamente 40°C maior em comparação a proteína apo, indicando que o estado de dobramento da proteína é energeticamente mais favorável na presença de  $Ca^{2+}$ , sendo necessária maior quantidade de energia para promover a desnaturação da proteína ( Figura 15).

Além do deslocamento do  $T_m$ , os resultados mostraram o aumento do  $\Delta H_{cal}$ , aumentando quase o dobro na condição cálcio em relação ao apo, indicando que é necessária mais energia para romper as interações intramoleculares, reforçando que o cálcio promove o aumento da estabilidade térmica da proteína (Celej *et al.*, 2003). Também foram observada alterações nos valores de  $\Delta C_p$  indicando mudanças na exposição da proteína ao solvente durante o processo de desnaturação, indicando uma reorganização conformacional induzida pela presença de cálcio (Tabela 1).

Os resultados apresentados indicam que que ligação da proteína SmE16 a íons de  $Ca^{2+}$  promove a estabilização estrutural e energeticamente favorável, conforme o comportamento de proteínas da família EF-hand descritas na literatura (Sanagavarapu *et al.*, 2016; Juhász *et al.*, 2020).

A SmE16 apresenta expressão enriquecida nas glândulas do esôfago do *S. mansoni*, uma região diretamente relacionada à alimentação hematófaga do parasito. Nesse local ocorre a ingestão e o processamento do sangue, além da liberação de produtos parasitários que entram em contato com componentes circulantes do hospedeiro (Figueiredo *et al.*, 2025b). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que em amostras do soro de camundongos e humanos a proteína SmE16 interage com proteínas associadas à imunidade inata, ao sistema complemento, à regulação inflamatória e a processos de reconhecimento molecular atuando em etapas iniciais da resposta imune, como no reconhecimento de padrões moleculares, ativação de cascatas proteolíticas e modulação da atividade celular (Tabelas 2 e 3) (Chen *et al.*, 2025). A identificação de proteínas associadas ao

sistema complemento e ao metabolismo lipídico nas amostras observadas demonstram a predominância de componentes plasmáticos observadas de forma abundante nas interações, dentre elas, destaca-se a mannose-binding protein lectin A (MBL1), que pertence à família das colectinas e atua como receptor de reconhecimento de padrões na imunidade inata sendo capazes de reconhecer estruturas ricas em carboidratos como manose e glicose presentes na superfície dos patógenos e a ligação desencadeia a ativação das vias das lectinas do sistema complemento (Takahashi *et al.*, 2006). Essa proteína foi identificada nas amostras exclusivas na presença de cálcio, podendo está relacionada às mudanças estruturais da proteína SmE16 na presença deste íon. Também foi identificadas diferentes apolipoproteínas, sendo elas apolipoproteína A-I (APOA1), apolipoproteína A-IV (APOA4) e apolipoproteína E (APOE) que consistem em proteínas plasmáticas associadas a lipoproteínas circulantes. Sua presença recorrente em diferentes condições experimentais e sua presença em diferentes organismos sugerem um perfil conservado possivelmente associado à sua abundância no meio biológico (Phillips, 2014; Wang *et al.*, 2015; Getz e Reardon, 2009 ). A identificação da alpha-antitrypsin em amostras do soro de camundongo e humano está de acordo com a presença de proteínas comumente identificadas neste estudo. A SERPINA1 consiste em um inibidor serinoprotease descrito comumente em atuando em processos de regulação da resposta inflamatória modulando a atividade de neutrófilos (Janciauskiene *et al.*, 2018). Esse perfil é compatível com estudos que demonstram que proteínas secretadas por helmintos são capazes de interagir com componentes da imunidade inata do hospedeiro, incluindo moléculas solúveis do plasma e do sistema complemento, atuando na interface parasita-hospedeiro e contribuindo para a modulação da resposta imune (Hewitson *et al.*, 2009). Nossos achados se alinham ao que já foi descrito para a SJE16, proteína homóloga em *S. japonicum*, para a qual foi demonstrada a capacidade de modular a resposta imune inata, incluindo a ativação de macrófagos e a indução de mediadores inflamatórios (Fang *et al.*, 2015). Esses dados reforçam a relevância da SmE16 no contexto da interação parasita-hospedeiro, além de indicar a necessidade de estudos futuros para elucidar os mecanismos envolvidos e validar essas interações.

## 6. CONCLUSÃO

- A proteína SmE16 foi expressa e purificada com sucesso, permitindo a realização dos experimentos propostos ao longo do trabalho.
- Os experimentos de ITC mostraram que a SmE16 interage com íons de cálcio, enquanto não foi observada interação significativa com íons de  $Mg^{2+}$ , indicando especificidade pelo  $Ca^{2+}$ .
- A ligação ao cálcio promove mudanças conformacionais na SmE16, sugerindo que a interação com o íon está associada a uma reorganização estrutural da proteína.
- A análise por DSC demonstrou que a presença de cálcio aumenta significativamente a estabilidade térmica da SmE16, evidenciada pelo aumento da temperatura de transição térmica e da entalpia de desnaturação, indicando que a proteína é mais estável quando ligada ao  $Ca^{2+}$ .
- Os experimentos de SEC e crosslinking indicaram que o cálcio influencia o estado oligomérico da SmE16, sugerindo que as mudanças conformacionais induzidas pelo íon podem afetar interações proteína-proteína.
- Os ensaios de *pull-down* permitiram identificar que os potenciais parceiros proteicos da SmE16 com hospedeiros pode estar relacionado a respostas imunológicas, indicando o seu potencial na interface parasita-hospedeiro.
- Os resultados obtidos indicam que a SmE16 é uma proteína cuja estrutura, estabilidade térmica e organização oligomérica são moduladas pela ligação ao cálcio, evidenciando que esse íon exerce um papel central na regulação de suas propriedades biofísicas. Além disso, a identificação de proteínas parceiras, incluindo proteínas associadas a processos da imunidade do hospedeiro, sugere que a SmE16 é capaz de estabelecer interações relevantes na interface parasita-hospedeiro. Em conjunto, esses achados fornecem uma base consistente para estudos futuros que visem esclarecer o papel funcional da SmE16 e sua potencial participação em vias celulares mediadas por cálcio.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLA, M. H. et al. Drug discovery for schistosomiasis: Hit and lead compounds identified in a library of known drugs by medium-throughput phenotypic screening. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, n. 7, jul. 2009.
- ANDRADE, L. F.; MOURÃO, M. M.; GERHARDT, A. et al. The *Schistosoma mansoni* calcium-binding protein family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 154, p. 1–10, 2007.
- ANDREWS, D. M. et al. Recognition of the nonclassical MHC class I molecule H2-M3 by the receptor Ly49A regulates the licensing and activation of NK cells. *Nature Immunology*, v. 13, n. 12, p. 1171–1177, 2012.
- CARAFOLI, E.; KREBS, J. Why calcium? How calcium became the best communicator. *Journal of Biological Chemistry*, v. 291, n. 40, p. 20849–20857, 30 set. 2016.
- CHAN, J. D. et al. A mini-review on praziquantel: pharmacology and resistance. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 199, p. 1–10, 2015.
- CHASTONAY, A. H. M.; CHASTONAY, O. J. Housing risk factors of four tropical neglected diseases: a brief review of the recent literature. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 7, n. 7, p. 143, 2022.
- CIOLI, D. et al. Decades down the line: the viability of praziquantel for future schistosomiasis treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 10, n. 8, p. 835–837, 2012.
- CLAPHAM, D. E. Calcium signaling. *Cell*, v. 131, n. 6, p. 1047–1058, 2007.
- COLES, G. C.; WILSON, R. A. *Schistosoma mansoni*: immunomodulatory proteins and immune evasion. *Parasitology*, v. 124, supl. 1, p. S33–S42, 2002.
- COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. *The Lancet*, v. 383, n. 9936, p. 2253–2264, 2014.

DA SILVA, B. M. et al. High schistosomiasis-related mortality in Northeast Brazil: trends and spatial patterns. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 55, 2022.

DAMIAN, R. T. Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *The American Naturalist*, v. 98, p. 129–149, 1964.

DAMIAN, R. T. Molecular mimicry revisited. *Parasitology Today*, v. 3, n. 9, p. 263–266, 1987.

DAY, T. A.; BENNETT, J. L. Calcium-dependent neuromuscular function in helminths. *Parasitology*, v. 108, p. S95–S104, 1994.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, dez. 2008.

EKPO, U. F. et al. Schistosomiasis in infants and pre-school-aged children in sub-Saharan Africa: implication for control. *Parasitology*, v. 139, n. 7, p. 835–841, 2012.

ENGELS, D.; ZHOU, X. N. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infectious Diseases of Poverty*, 28 jan. 2020.

EVERTS, B. et al. Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. *Journal of Experimental Medicine*, v. 209, n. 10, p. 1753–1767, 2012.

FANG, Y. et al. SjE16.7 activates macrophages and promotes *Schistosoma japonicum* egg-induced granuloma development. *Acta Tropica*, v. 149, p. 49–58, 2015.

FEASEY, N. et al. Neglected tropical diseases. *British Medical Bulletin*, v. 93, n. 1, p. 179–200, 2010.

FIGUEIREDO, T. R. et al. Revisiting SmE16, a calcium-binding protein from *Schistosoma mansoni* with unknown functions. *Biochimie*, 2025.

- FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 1, n. 3, p. 295–299, 2004.
- GREENBERG, R. M. Are Ca<sup>2+</sup> channels targets of praziquantel action? *International Journal for Parasitology*, v. 33, p. 1–9, 2003.
- GREENBERG, R. M. Calcium signaling in schistosomes: mechanisms and therapeutic targets. *International Journal for Parasitology*, v. 35, p. 393–402, 2005.
- GREENBERG, R. M. Calcium signaling in schistosomes: mechanisms and therapeutic targets. *International Journal for Parasitology*, v. 43, p. 3–13, 2013.
- GREENBERG, R. M. Are Ca<sup>2+</sup> channels targets of praziquantel action revisited. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 8, p. 1–9, 2018.
- GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2006.
- GETZ, G. S.; REARDON, C. A. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *Journal of Lipid Research*, v. 50, p. S156–S161, 2009.
- GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. *The Lancet*, v. 368, n. 9541, p. 1106–1118, 2006.
- HALL, S. L. et al. Insights into blood feeding by schistosomes from a proteomic analysis of worm vomitus. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 179, n. 1, p. 18–29, 2011.
- HAMBROOK, J. R.; HANINGTON, P. C. Immune evasion strategies of schistosomes. *Frontiers in Immunology*, v. 11, art. 624178, 2021.
- HEWITSON, J. P.; GRAINGER, J. R.; MAIZELS, R. M. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 167, n. 1, p. 1–11, 2009.
- HOTEZ, P. J. et al. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *Journal of Clinical Investigation*, abr. 2008.

- IKURA, M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 21, p. 14–17, 1996.
- JANCIAUSKIENE, S. et al. The multifaceted effects of alpha-1-antitrypsin on neutrophil functions. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, p. 341, 2018.
- KATZ, N. Schistosomiasis in Brazil: epidemiology and control. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 1, e170249, 2018.
- KING, C. H. Helminthiasis epidemiology and control: scoring successes and meeting the remaining challenges. *Advances in Parasitology*, v. 103, p. 11–30, 2019.
- KURIL, A. K. Differential scanning calorimetry: a powerful and versatile tool for analyzing proteins and peptides. *Journal of Pharmaceutical Research International*, v. 36, n. 7, p. 179–187, 2024.
- LEES, J. G. et al. CDtool—an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. *Analytical Biochemistry*, v. 332, n. 2, p. 285–289, 2004.
- LEBU, S. et al. Soil-transmitted helminths: a critical review of the impact of co-infections and implications for control and elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 17, n. 8, p. e0011496, 2023.
- LEWIT-BENTLEY, A.; RÉTY, S. EF-hand calcium-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 10, p. 637–643, 2000.
- LI, Q. et al. Global trends of schistosomiasis burden from 1990 to 2021 across 204 countries and territories. *Acta Tropica*, v. 261, p. 107504, 2025.
- LOVERDE, P. T. Schistosomiasis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York: Springer, 2019. v. 1154, p. 45–70.
- MACIEL, L. F. et al. Weighted gene co-expression analyses point to long non-coding RNA hub genes at different *Schistosoma mansoni* life-cycle stages. *Frontiers in Genetics*, v. 10, 12 set. 2019.
- MAIZELS, R. M.; SMITH, K. A. Regulatory T cells in infection. *Nature Reviews Immunology*, v. 17, p. 217–230, 2017.

MAIZELS, R. M.; YAZDANBAKHSH, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, v. 3, p. 733–744, 2003.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. *Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas*. Brasília, 2024.

MOSER, D.; DOENHOFF, M. J.; KLINKERT, M. Q. The egg antigen SmE16 of *Schistosoma mansoni* is a calcium-binding protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 51, p. 229–238, 1992.

NAYAK, A. et al. Complement and non-complement activating functions of C1q: a prototypical innate immune molecule. *Innate Immunity*, v. 18, n. 2, p. 350–363, 2012.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, p. 499–511, 2002.

PHILLIPS, M. C. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 35, p. 24020–24029, 2014.

PIRZAMAN, A. T. et al. Prevalence of human *Schistosoma mansoni* infection in endemic regions (2010–2024): a systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*, v. 77, 2024.

REY, L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SANAGAVARAPU, K. et al. Calcium binding and disulfide bonds regulate the stability of secretagogin towards thermal and urea denaturation. *PLoS One*, v. 11, n. 11, p. e0165709, 2016.

SCHOPPER, S. et al. Measuring protein structural changes on a proteome-wide scale using limited proteolysis-coupled mass spectrometry. *Nature Protocols*, v. 12, n. 11, p. 2391–2410, 2017.

SILVA DA PAZ, W. et al. Basic and associated causes of schistosomiasis-related mortality in Brazil: a population-based study and a 20-year time series of a disease still neglected. *Journal of Global Health*, v. 11, p. 04061, 2021.

SKORUPSKA, A. et al. Calcium ions modulate the structure of the intrinsically disordered nucleobindin-2 protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 154, p. 1091–1104, 1 jul. 2020.

STOLK, W. A. et al. Between-country inequalities in the neglected tropical disease burden in 1990 and 2010, with projections for 2020. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 5, p. e0004560, 2016.

THEVENOT, P. et al. Interactions between helminth glycans and host immune cells. *Molecular Immunology*, v. 48, p. 2069–2076, 2011.

TAKAHASHI, K. et al. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Current Opinion in Immunology*, v. 18, n. 1, p. 16–23, 2006.

TURNBULL, W. B.; DARANAS, A. H. On the value of  $c$ : can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *Journal of the American Chemical Society*, v. 125, n. 48, p. 14859–14866, 2003.

VALLONE, R. et al. Metal binding affinity and structural properties of calmodulin-like protein 14 from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Science*, v. 25, n. 8, p. 1461–1471, 2016.

VAN DIE, I.; CUMMINGS, R. D. Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response. *Glycobiology*, v. 20, p. 2–12, 2010.

VAN LEENE, C. et al. Exploring protein conformations with limited proteolysis coupled to mass spectrometry. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 50, n. 2, p. 143–155, 2025.

WANG, F. et al. Apolipoprotein A-IV: a protein intimately involved in metabolism. *Journal of Lipid Research*, v. 56, n. 8, p. 1403–1418, 2015.

WANG, W.; WANG, L.; LIANG, Y.-S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitology Research*, v. 111, p. 1871–1877, 2012.

WILSON, R. A. et al. The schistosome esophagus is a hotspot for microexon and lysosomal hydrolase gene expression: implications for blood processing. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 12, 7 dez. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030*. Geneva, 2020.

WYNN, T. A.; THOMPSON, R. W.; CHEEVER, A. W.; MENTINK-KANE, M. M. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological Reviews*, v. 201, p. 156–167, 2004.

WYNN, T. A.; THOMPSON, R. W. Mechanisms of immunopathology in schistosomiasis. *Current Opinion in Immunology*, v. 59, p. 47–54, 2019.

YÁÑEZ, M.; GIL-LONGO, J.; CAMPOS-TOIMIL, M. Calcium binding proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 740, p. 461–482, 2012.

ZHENG, J.; ZENG, X. H.; WANG, S. Q. Calcium ion as cellular messenger. *Science China Life Sciences*, v. 58, n. 1, p. 1–5, 2015.

## APÊNDICE A – Análises proteômicas do soro murino

Este apêndice apresenta as tabelas tratadas, para a identificação de potenciais proteínas interagentes com a SmE16 nas amostras de soro de camundongo, obtidas por espectrometria de massas analisadas em diferentes condições experimentais. São apresentados parâmetros de identificação das proteínas, incluindo score, número de peptídeos identificados, cobertura de sequência e parâmetros de intensidade.

**Nota:** N indica réplicas experimentais independentes (N1, N2, N3).

Tabela A1 – Proteínas identificadas no soro de camundongo na condição sem cálcio (N1)

Prot.	Gene	Org.	Score	Pep.	Cov (%)	FPR	Top3 Int.
Apolipoprotein A-IV	Apoa 4	<i>Mus musculus</i>	$1.37 \times 10^7$	6	17,47	0.00	230406

Tabela A2 – Proteínas identificadas no soro de camundongo na condição com cálcio (N1)

Prot.	Gene	Org.	Score	Pep.	Cov (%)	FPR	Top3 Int.
Apolipoprotein A-IV	Apoa 4	<i>Mus musculus</i>	$2.85 \times 10^7$	16	42.78	0.00	507968
Apolipoprotein A-I	Apoa 1	<i>Mus musculus</i>	$6.30 \times 10^6$	7	25.38	0.00	188077
Carboxypeptidase N	Cpn1	<i>Mus musculus</i>	$2.62 \times 10^6$	4	8.53	0.00	94019
Mannose-binding protein A	Mbl1	<i>Mus musculus</i>	$2.18 \times 10^6$	3	12.55	0.00	17083
Apolipoprotein E	ApoE	<i>Mus musculus</i>	$1.78 \times 10^6$	4	13.50	0.00	20430
Paraoxonase 1	Pon1	<i>Mus musculus</i>	$1.69 \times 10^6$	2	~10	0.00	214115

Tabela A3 – Proteínas identificadas no soro de camundongo na condição APO+Ca<sup>2+</sup> (N2)

Prot.	Gene	Org.	Score	Pep.	Cov (%)	FPR	Top3 Int.
Apolipoprotein A-IV	Apoa 4	<i>Mus musculus</i>	$5.18 \times 10^6$	8	27.34	0.00	177243
Apolipoprotein A-I	Apoa 1	<i>Mus musculus</i>	$6.83 \times 10^6$	6	18.94	0.00	224094
Alpha-1-antitrypsin family	Serpin a1	<i>Mus musculus</i>	$7.47 \times 10^5$	6	11.38	0.00	45978

Tabela A4 – Proteínas identificadas no soro de camundongo na condição APO+Ca<sup>2+</sup> (N3)

Prot.	Gene	Org.	Score	Pep.	Cov (%)	FPR	Top3 Int.
Apolipoprotein A-IV	Apoa 4	<i>Mus musculus</i>	$3.42 \times 10^7$	18	47.34	0.00	616241
Apolipoprotein E	ApoE	<i>Mus musculus</i>	$3.69 \times 10^6$	4	16.40	0.00	47179
Mannose-binding protein A	Mbl1	<i>Mus musculus</i>	$3.03 \times 10^6$	3	12.55	0.00	50329

## APÊNDICE B – Análises proteômicas do soro de humano

Este apêndice apresenta as tabelas tratadas, para a identificação de potenciais proteínas interagentes da SmE16 em amostras de soro de humano, obtidas por espectrometria de massas e analisadas em diferentes condições experimentais. São apresentados parâmetros de identificação proteína, incluindo score, número de peptídeos identificados, cobertura de sequência e parâmetros de intensidade.

As tabelas a seguir incluem todas as proteínas identificadas após filtração em cada condição experimental analisada.

Tabela B1 – Proteínas identificadas a partir de banda intensa no soro humano na condição APO+Ca<sup>2+</sup> (His-tag)

Prot.	Gene	Org.	Score	Pep.	Cov (%)	FPR	Top3 Int.
Alpha-1-antitrypsin	Serpin a1	<i>Homo sapiens</i>	$8.37 \times 10^7$	7	58.85	0.00	1973349
Vitronectin	Vtn	<i>Homo sapiens</i>	$9.21 \times 10^6$	5	16.53	0.00	526687
Apolipoprotein A-I	Apoa1	<i>Homo sapiens</i>	$8.33 \times 10^6$	3	22.85	0.00	130765

Tabela B2 – Proteínas identificadas no soro humano na condição APO (His-tag)

Prot.	Gene	Org.	Score	Pep.	Cov (%)	FPR	Top3 Int.
Alpha-1-antitrypsin	Serpin a1	<i>Homo sapiens</i>	$3.17 \times 10^7$	10	25.84	0.00	700776
Vitronectin	Vtn	<i>Homo sapiens</i>	$2.31 \times 10^6$	3	7.11	0.00	175250

Tabela B3 – Proteínas identificadas no soro humano na condição Ca<sup>2+</sup> (His-tag)

Prot.	Gene	Org.	Score	Pep.	Cov (%)	FPR	Top3 Int.
Vitronectin	Vtn	<i>Homo sapiens</i>	$1.16 \times 10^6$	3	7.11	0.00	87601

Tabela B4 – Proteínas identificadas no soro humano na condição APO (GST-tag)

Prot.	Gene	Org.	Score	Pep.	Cov (%)	FPR	Top3 Int.
Alpha-1-antitrypsin	Serpin a1	<i>Homo sapiens</i>	$3.36 \times 10^7$	9	24.88	0.00	500666
Vitronectin	Vtn	<i>Homo sapiens</i>	$3.18 \times 10^6$	4	10.04	0.00	196738
Apolipoprotein A-I	Apoa1	<i>Homo sapiens</i>	$4.09 \times 10^6$	2	~10	0.00	135006

Tabela B5 – Proteínas identificadas no soro humano na condição Ca<sup>2+</sup> (GST-tag)

<b>Prot.</b>	<b>Gene</b>	<b>Org.</b>	<b>Score</b>	<b>Pep.</b>	<b>Cov (%)</b>	<b>FPR</b>	<b>Top3 Int.</b>
Alpha-1-antitrypsin	Serpin a1	<i>Homo sapiens</i>	$2.76 \times 10^7$	11	27.1	0.00	$4.76 \times 10^5$
Apolipoprotein A-I	Apoa1	<i>Homo sapiens</i>	$1.51 \times 10^6$	2	10.2	0.00	$9.40 \times 10^4$