



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

PAULO ANDERSON PAIVA MARTINS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA PROTEÍNA
RELACIONADA A EPENDIMINA PRESENTE NA ESPONJA MARINHA

Amphimedon compressa (DUCHASSAING & MICHELOTTI, 1864)

FORTALEZA

2025

PAULO ANDERSON PAIVA MARTINS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA PROTEÍNA
RELACIONADA A EPENDIMINA PRESENTE NA ESPONJA MARINHA *Amphimedon*
compresa (DUCHASSAING & MICHELOTTI, 1864)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia de recursos naturais.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

Fortaleza

2025

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

P17p Martins, Paulo Anderson Paiva.

Purificação e caracterização bioquímica de uma proteína relacionada a ependimina presente na esponja marinha *Amphimedon compressa* (Duchassaing & Michelotti, 1864) / Paulo Anderson Paiva Martins. – 2025.

36 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

1. Bioprospecção. 2. Esponjas marinhas. 3. EPDR. 4. Química de proteínas. I. Título.

CDD 661

PAULO ANDERSON PAIVA MARTINS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA PROTEÍNA
RELACIONADA A EPENDIMINA PRESENTE NA ESPONJA MARINHA *Amphimedon*
compresa (DUCHASSAING & MICHELOTTI, 1864)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia de recursos naturais.

Aprovada em: 20 / 02 / 2025.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Renato Cézar Farias Torres
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais, Paulo Henrique e Silvia Helena, que me apoiaram em minhas escolhas e possibilitaram que eu esteja onde estou hoje. Sou eternamente grato por tudo o que fizeram por mim e por todos os sacrifícios que tiveram que fazer para que eu tivesse uma boa educação. Muitíssimo obrigado por tudo! Espero, um dia, poder retribuir todo o apoio que recebi em minha jornada.

Aos meus amigos do curso, que me acompanharam nas disciplinas que cursei durante esses cinco anos de graduação e que me ajudaram de diversas formas. Tivemos bons momentos juntos, dentro e fora da sala de aula. No começo, eu não conhecia ninguém, e é gratificante ver que, no final, pude encontrar pessoas tão incríveis, que estão aqui para me aconselhar e para irmos juntos.

A todos do laboratório, especialmente aos meus amigos para toda a vida, Bianca e Israel, que me acompanharam nessa jornada de quase um ano e meio. Obrigado a todos que, de alguma forma, contribuíram com minha pesquisa ninguém faz ciência sozinho. Se hoje estou conseguindo finalizar este trabalho, é porque tive a ajuda de vocês. Sinto que aprendi bastante nesse curto período no laboratório e evoluí muito, tanto como pesquisador quanto como pessoa. Muito obrigado a todos! Mal posso esperar para continuarmos essa jornada por mais alguns anos.

Ao meu orientador, que conseguiu me suportar por todo esse tempo e que me apresentou uma forma mais amigável e descontraída de orientação. Obrigado por embarcar nas ideias que tive para o trabalho e por me permitir liberdade na pesquisa. Sinto que meu tempo de iniciação científica no laboratório foi muito bem aproveitado, principalmente pela confiança que você depositou em mim. Sentir que eu tinha seu apoio foi muito gratificante, saber que podia bater na sua porta e seria ouvido. Espero que possamos continuar essa parceria na pós-graduação.

Por fim, agradeço ao CNPq pelo suporte financeiro à pesquisa, que me permitiu continuar na faculdade. Também agradeço à Universidade Federal do Ceará, principalmente ao RU, que forneceu a energia necessária para que essa jornada fosse possível.

“Se eu soubesse antes o que sei agora Erraria
tudo exatamente igual” (Humberto Gessinger)

RESUMO

As ependiminas são glicoproteínas inicialmente identificadas em peixes teleósteos, associadas a funções neuroplásticas e regenerativas, mas estudos recentes evidenciam sua presença em diversos organismos, incluindo esponjas marinhas, apresentando características altamente conservadas entre si e desempenhando uma diversidade de funções associadas a essas proteínas. Este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar bioquimicamente uma proteína relacionada às ependiminas (EPDR) extraída da esponja *Amphimedon compressa*. Para tanto, empregou-se um protocolo que envolveu extração do material biológico, fracionamento por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel e cromatografia de exclusão molecular, seguido de análises da estimativa da massa molecular da proteína em condições desnaturadas e em estado nativo por SDS-PAGE e exclusão molecular, respectivamente, espectropolarimetria de dicroísmo circular e sequenciamento por LC-MS/MS. A proteína purificada, denominada AC-EPD, apresentou uma massa de aproximadamente 25 kDa em condições desnaturadas e 57 kDa em estado nativo, sugerindo a formação de dímeros estabilizados por interações não covalentes. Os espectros de dicroísmo circular indicaram uma estrutura secundária predominantemente beta, a proteína é composta por % de alfa hélice, 42% por folhas betas, 22% por voltas betas e 32% por alças e teve a temperatura de melting determinada em 79,18°C. E o sequenciamento confirmou a relação com ependiminas de outras espécies, sobretudo com duas ependiminas provenientes de esponjas marinhas. Esses resultados demonstram a eficiência do protocolo adotado e abrem perspectivas para a aplicação das EPDRs como transportadoras de moléculas hidrofóbicas, contribuindo para o avanço da bioprospecção de recursos naturais em esponjas marinhas.

Palavras chaves: bioprospecção; esponjas marinhas; EPDR; química de proteínas.

ABSTRACT

Ependimins are glycoproteins initially identified in teleost fish and associated with neuroplastic and regenerative functions. Recent studies, however, have revealed their presence in various organisms, including marine sponges, where they exhibit highly conserved characteristics and perform a range of functions. This work aimed to isolate and biochemically characterize an ependimin-related protein (EPDR) extracted from the sponge *Amphimedon compressa*. To achieve this, a protocol was employed that involved the extraction of biological material, fractionation by ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex, and size exclusion chromatography, followed by analyses to estimate the protein's molecular mass under denaturing conditions and in its native state by SDS-PAGE and size exclusion chromatography, respectively, as well as circular dichroism spectropolarimetry and LC-MS/MS sequencing. The purified protein, named AC-EPD, exhibited a mass of approximately 25 kDa under denaturing conditions and 57 kDa in its native state, suggesting the formation of dimers stabilized by non-covalent interactions. The circular dichroism spectra indicated a predominantly beta secondary structure; the protein is composed of 3% alpha helix, 42% beta sheets, 22% beta turns, and 32% loops, and had a melting temperature determined at 79.18°C. Sequencing confirmed its relationship with ependimins from other species, particularly with two ependimins derived from marine sponges. These results demonstrate the efficiency of the adopted protocol and open prospects for the application of EPDRs as carriers of hydrophobic molecules, contributing to advances in the bioprospecting of natural resources in marine sponges.

Keywords: bioprospecting; marine sponges; EPDR; protein chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Tabela 1 – Representação diagramática de uma esponja marinha	12
Tabela 2 – <i>Amphimedon compresa</i> (Duchassaing & Michelotti, 1864), no mar do Caribe.....	15
Figura 3 – Estrutura geral de uma ependimina	17
Figura 4 – Esponjas marinhas que possuem EPDR relatadas na literatura	18
Figura 5 – Coloração do extrato e das frações	24
Figura 6 – Cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel da fração 30-60% de sulfato de amônio do extrato de <i>A. compressa</i>	25
Figura 7 – Cromatografia de exclusão molecular do PII da cromatografia de troca iônica	26
Figura 8 – SDS-PAGE do P2 da cromatografia de exclusão molecular	27
Figura 9 – Estimativa da massa molecular de AC-EPD em cromatografia de exclusão molecular	28
Figura 10 – Espectros de dicroísmo circular de AC-EPD	29
Figura 11 – Análise da temperatura de Melting da AC-EPD	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros usados na análise de dados DDA-MS e quantificação sem rótulo usando o software MaxQuant e MaxLFQ	23
Tabela 2 – Purificação de AC-EPD	26
Figura 3 – Sequências de peptídeos obtidas pelo MaxQuant	30
Figura 4 – Organismos correspondentes aos peptídeos obtidos na análise no MaxQuant	31

SUMÁRIO

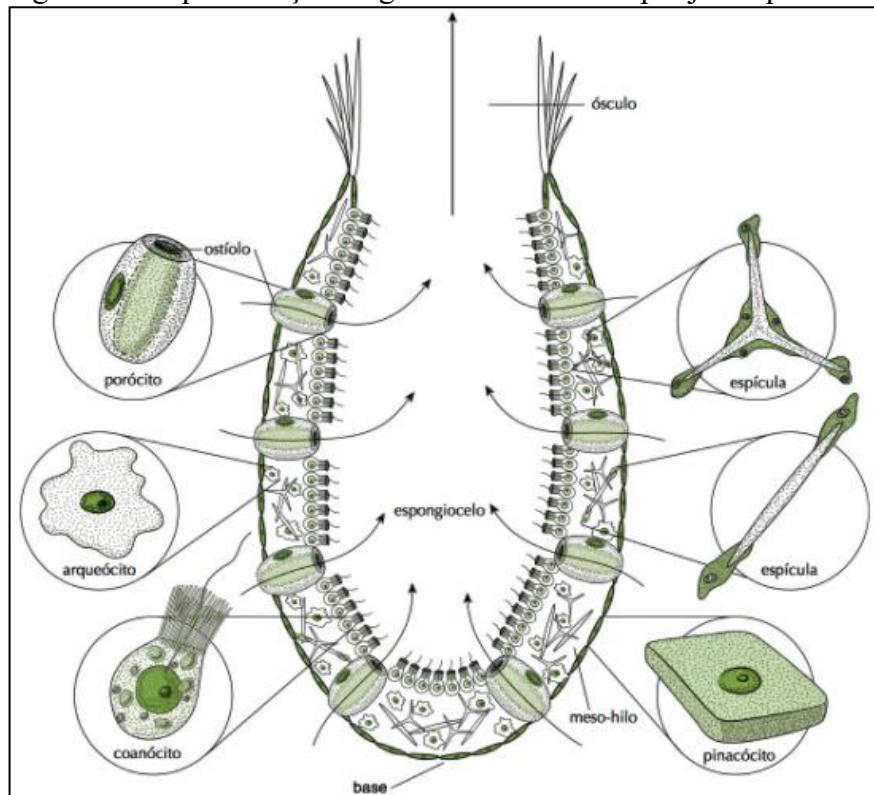
1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Esponjas marinhas	12
1.1.2	<i>Gênero Amphimedon.....</i>	13
1.2	Ependiminas	15
1.2.1	<i>Definição e aspectos gerais</i>	16
1.2.2	<i>Ependiminas de esponjas marinhas</i>	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivo específicos	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Coleta da esponja	20
3.2	Preparação do extrato	20
3.3	Fracionamento do extrato por precipitação com sulfato de amônio	20
3.4	Purificação da proteína	20
3.5	Avaliação da pureza e estimativa da massa molecular	21
3.6	Análises por Espectropolarimetria de dicroísmo circular	21
3.7	Determinação da sequência de aminoácidos	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	Purificação da ependimina	24
4.2	Avaliação da pureza	27
4.3	Análise por dicroísmo circular	28
4.4	Determinação da sequência de aminoácidos	30
5	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esponjas marinhas

As esponjas, pertencentes ao filo Porifera (derivado do latim *porus*, "poro", e *ferre*, "carregar"), são organismos multicelulares que não dispõem de órgãos nem de sistemas nervosos ou sensoriais. Esses animais, que se fixam ao substrato e se alimentam por filtração, normalmente possuem um esqueleto interno formado por espículas constituídas de carbonato de cálcio, sílica ou espongina. Em sua forma mais simples, apresentam-se como sacos porosos, cuja face interna é revestida por células flageladas. Esse compartimento interno, chamado espongiocelo, é forrado pelos coanócitos, células que impulsionam a água, a qual adentra por pequenas aberturas denominadas ostíolos e é expulsa por aberturas maiores, conhecidas como ósculos. (Figura 1) (BRUSCA, 2019; FRANSOZO, 2017; HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004; PECHENIK, 2016).

Figura 1 – Representação diagramática de uma esponja simples.



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

Esses organismos possuem uma complexa rede de poros e canais que formam um sistema aquífero responsável por bombear a água por meio da ação dos coanócitos. Esse fluxo

contínuo permite que alimentos e oxigênio sejam transportados para o interior do animal, enquanto os resíduos são expelidos. O sistema também desempenha papel essencial nas trocas gasosas e na disseminação e captura de espermatozoides, garantindo funções vitais para a sobrevivência da esponja (BRUSCA, 2019; FRANSOZO, 2017; HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004; PECHENIK, 2016).

Embora sejam mais comuns em ambientes marinhos, as esponjas também podem ser encontradas em água doce. Até o ano de 2025 cerca de 9.700 espécies foram catalogadas e exibem uma grande diversidade em suas formas, cores e tamanhos com variação de 3 – 10 milímetros a 1,5 – 2 metros. Elas apresentam grande diversidade em tamanho, podendo variar de poucos milímetros a até dois metros de altura e diâmetro, e exibem uma ampla gama de cores, que incluem tons vibrantes de vermelho, amarelo, laranja, verde e púrpura (DE VOOGD *et al.*, 2025; BRUSCA, 2019; HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004; PECHENIK, 2016).

Tradicionalmente, a organização das esponjas é fundamentada na composição mineral de seus esqueletos internos. Elas são divididas em quatro classes principais: *Demospongiae*, *Homoscleromorpha*, *Hexactinellida* e *Calcarea*. Nas três primeiras, as espículas se formam a partir da sílica, enquanto que em *Calcarea* o mineral predominante é o carbonato de cálcio. Assim, as esponjas se destacam como os únicos animais conhecidos que utilizam a sílica como principal componente mineral de seus esqueletos. A classe *Demospongiae* reúne a maior parte das esponjas catalogadas, representando 90% das espécies conhecidas. Os organismos dessa classe apresentam, em seu esqueleto interno, espículas formadas por sílica ou espongina. Além de apresentarem uma grande potencial biotecnológico e uma ampla gama de aplicações na indústria. (BRUSCA, 2019; FRANSOZO, 2017; PECHENIK, 2016).

As esponjas revelam-se como uma fonte excepcional de compostos bioativos, oferecendo uma variedade ampla de moléculas com funções diversificadas. Esses compostos atuam na defesa contra predadores, impedem a fixação de organismos indesejados em suas superfícies, protegem contra radiações e facilitam a manutenção de interações simbióticas. Devido a essas propriedades singulares, a indústria farmacêutica tem demonstrado grande interesse, explorando suas ações antimicrobianas, antivirais, anti-inflamatórias e antimitóticas. Além disso, diversas dessas moléculas já estão sendo empregadas em tratamentos contra câncer e no combate a infecções causadas por vírus e bactérias. (BRUSCA, 2019; FRANSOZO, 2017; PAPON; COPP; COURDAVULT, 2022).

1.1.2 Gênero *Amphimedon*

O gênero *Amphimedon* pertence à família *Niphatidae*, ordem *Dictyoceratida*, sendo um grupo de esponjas marinhas da classe *Demospongiae*. Este grupo é moderadamente abundante, com cerca de 60 espécies válidas descritas. As espécies desse gênero são predominantemente encontradas em águas rasas de várias regiões marinhas, incluindo o Caribe, o Atlântico Sul, o Indo-oeste do Pacífico e até a Antártica, com ocorrência também na Austrália, Papua-Nova Guiné, Nova Caledônia e Indonésia (DESQUEYROUX-FAÚNDEZ & VALENTINE, 2002; HELMY & VAN SOEST, 2005).

Amphimedon se distingue de outros membros da família *Niphatidae* por apresentar um esqueleto fibroso com uma superfície lisa ao olhar macroscópico, mas microtuberculada ao ser observada microscopicamente, geralmente com grande quantidade de espongina e sem microscleras. Superficialmente, essas esponjas podem se assemelhar ao gênero *Haliclona* (Chalinidae), com o qual foi agrupado por muitos anos (LAUBENFELS, 1936; WIEDENMAYER, 1977), até ser realocado para a família *Niphatidae* por VAN SOEST (1980). *Amphimedon* se diferencia de *Chalinidae* por apresentar uma rede de fibras multiespiculares maiores que percorrem longitudinalmente o choanosoma e se projetam para a superfície, além de uma retícula espicular-espongínica secundária menor e um esqueleto tangencial ectossomal com fibras secundárias organizadas em malhas arredondadas (DESQUEYROUX-FAÚNDEZ & VALENTINE, 2002).

As esponjas marinhas são fontes ricas de produtos naturais, entre 2010 e 2019, 2659 compostos foram observados nesses organismos. As esponjas contribuem com cerca de 47,2% das descobertas nessa área entre todos os invertebrados (CALADO *et al.*, 2022). O gênero *Amphimedon* destaca-se pela diversidade de metabólitos bioativos, como alcaloides e ácidos graxos, com propriedades antimicrobianas (KUBOTA *et al.*, 2017) e anticancerígenas (TSUKAMOTO *et al.*, 2000). Foi isolado de *Amphimedon compresa* (Figura 2) um precursor dos alcalóides manzamina, a ciclostelatamina, seu composto relacionado, a 8,8'-dieneciclostelatamina possui potentes atividades antibacterianas e antifúngicas. Outro composto, a anfitoxina, demonstrou atividade ictiotóxica contra o peixe-lua (*Xiphophorus variatus*) e atividade inseticida contra o gorgulho da batata-doce (*Cylas formicarius elegantulus*), com taxas de mortalidade de até 100% em altas concentrações. Além disso, foram isolados ácidos graxos fosfolipídicos monoinsaturados, como o (Z)-17-tricosenal e o ácido 16-tricosenoíco (XU *et al.*, 2007; ALBRIZIO *et al.*, 1995; THOMPSON *et al.*, 2010; CARBALLEIRA *et al.*, 1992).

Figura 2 – *Amphimedon compressa* (Duchassaing & Michelotti, 1864), no mar do Caribe.



Fonte: The sponge guide.

1.2 Ependiminas

1.2.1 Definição e aspectos gerais

As ependiminas são glicoproteínas secretadas e consistem de aproximadamente 200 aminoácidos, mantendo um padrão de conservação de quatro a seis cisteínas em sua estrutura primária que são previstas para formar pontes dissulfeto (MCDOUGALL *et al.*, 2018). As proteínas típicas chamadas ependiminas, originárias do canal ependimário de peixes teleósteos. É a glicoproteína mais abundante tanto no fluido extracelular cerebral (FEC) quanto no fluido cerebrospinal de peixes teleósteos, foram inicialmente vinculadas por desempenhar um papel crucial em funções como a regeneração neural, a consolidação da memória de longo prazo, apresentando aumento nos seus níveis após a ocorrência de um novo aprendizado, e a regulação da homeostase de cálcio no cérebro (SHASHOUA, 1991; SCHMIDT, 1995). Apesar de os mecanismos celulares específicos relacionados às suas funções em peixes ainda não serem totalmente compreendidos, a presença de diversos locais de ligação de Ca^{2+} sugere que se trata de uma proteína secretada para a matriz extracelular (SCHMIDT, 1995; GANSS & HOFFMANN, 1993; HOFFMANN & SCHWARZ, 1996).

Com o progresso das pesquisas, ficou claro que glicoproteínas relacionadas à ependimina (EPDR - *ependymin-related protein*) não estão restritas a peixes, mas também aparecem em outros vertebrados, como mamíferos. Nos mamíferos, a proteína MERPI foi identificada em camundongos e humanos, sendo expressa em vários tecidos normais e células

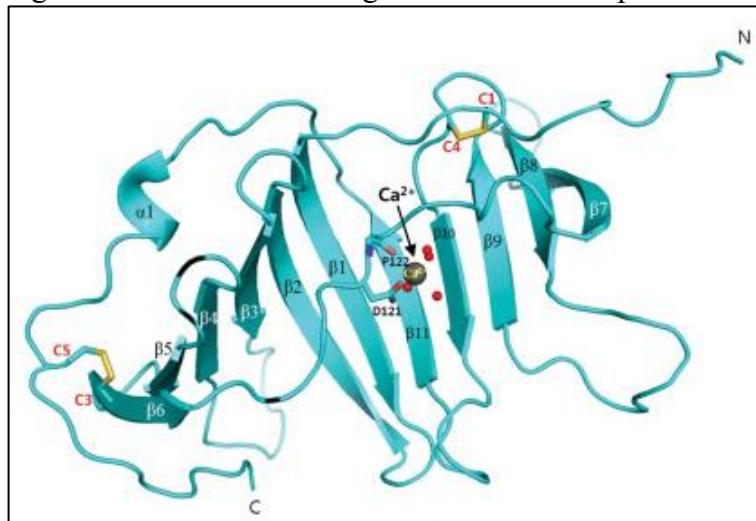
cancerígenas, diferentemente da expressão específica no cérebro dos peixes. Além disso, a forma humana dessa proteína, denominada UCC1, mostrou transcrição elevada em células tumorais colorretais (SHASHOUA, 1985; PARK *et al.*, 2019; APOSTOLOPOULOS *et al.*, 2001; GREGORIO-KING *et al.*, 2002; NIMMRICH *et al.*, 2001).

As ependiminas (Figura 3) possuem uma estrutura composta por onze fitas organizadas em duas camadas antiparalelas, acompanhadas de duas α -hélices sequência is na região C-terminal da proteína. Elas contêm entre quatro e seis resíduos de cisteína, capazes de formar ligações intra e intercadeias, além de apresentar pelo menos dois sítios de glicosilação do tipo N e locais de ligação ao íon cálcio. Verificou-se que, em outros organismos, as EPDRs podem desempenhar funções associadas ao transporte de moléculas hidrofóbicas, função essa distinta das observadas nas ependiminas de peixes. Essa capacidade pode estar ligada à sua aptidão para se organizarem em dímeros e à sua conformação côncava, que gera um bolsão central hidrofóbico (PARK *et al.*, 2019).

Proteínas EPDR desempenham diversos papéis em equinodermos e moluscos. Na estrela-do-mar coroa-de-espinhos, EPDR são secretadas durante a agregação ou como resposta a predadores, indicando uma função na comunicação conespecífica (HALL *et al.*, 2017). Em pepinos-do-mar, múltiplos genes EPDR estão associados a funções como a regeneração, sendo superexpressos em espécies como *Holothuria glaberrima* (SUÁREZ-CASTILLO *et al.*, 2004). Em moluscos, EPDRs participam da biomineralização e pigmentação da concha, como observado no abalone (JACKSON *et al.*, 2006; MARIE *et al.*, 2010), e estão presentes em proteomas de conchas de várias espécies (MANN *et al.*, 2012). Além disso, essas proteínas são reguladas em resposta a toxinas e metais em bivalves (SONG *et al.*, 2017), a desafios de patógenos em bivalves (JIANG *et al.*, 2017) e a estressores ambientais em bivalves e gastrópodes (MURAEVA *et al.*, 2016).

Apesar da ampla distribuição dessas proteínas em diversos organismos, os mecanismos celulares relacionados às suas funções são pouco compreendidos devido à escassez de estudos dedicados a essa área. A maioria das pesquisas concentra-se na caracterização estrutural das ependiminas de peixes, deixando assim uma lacuna significativa no entendimento do papel dessas biomoléculas em outras espécies animais.

Figura 3 – Estrutura geral de uma ependimina.



Fonte: Adaptado de PARK *et al.*, 2019. Legenda: As onzes fitas betas da estrutura são representadas por β . α representa as duas α -hélices. Os resíduos de cisteínas conservadas são representados por C. O sítio de ligação ao íon cálcio é representado por Ca^{2+} .

1.2.2 Ependiminas de esponjas marinhas

Estudos genômicos identificaram genes em esponjas marinhas que codificam EPDRs. Na classe Demosponge, os genomas de *Amphimedon queenslandica* tem a presença de dezessete genes associados às ependiminas, enquanto *Suberites domuncula* revelara a presença de dois genes associados a essa mesma classe de proteínas. Na classe Calcaria, a esponja *Sycon ciliatum* possui oito genes que codificam ependiminas, enquanto apenas um gene foi encontrado na esponja *Oscarella carmela*, pertencente à classe Homoscleromorpha (MCDOUGALL *et al.*, 2018).

Em esponjas marinhas existem poucos relatos de ependiminas isoladas e caracterizadas a nível estrutural. Até o presente momento somente duas ependiminas foram relatadas, a primeira foi na esponja marinha *Haliclona caerulea* (Figura 4A). Na ocasião a terminologia ependiminas não foi utilizada, a proteína foi denominada como H-3 lectin. Essa é uma proteína associada a um pigmento, que em sua estrutura primária contém cinco resíduos de cisteína conservados, sítio de glicosilação e alta semelhança com a ependimina codificada no genoma de *A. queenslandica* (CARNEIRO *et al.*, 2013).

A segunda ependimina encontrada em esponjas marinhas foi denominada de carotenoproteína azul, que também foi obtido a partir uma esponja marinha do gênero *Haliclona* (Figura 4B) e possui uma associação com um pigmento. A carotenoproteína apresenta seis

resíduos de cisteínas conservados, locais de glicosilação e uma estrutura tridimensional com a presença de um bolsão hidrofóbico (KAWASAKI *et al.*, 2023).

Figura 4 – Esponjas marinhas que possuem EPDR relatadas na literatura.



Fonte: Compilação do autor, imagem B adaptada de KAWASAKI *et al.*, 2023. Legenda: A – *Haliclona caerulea*; B – *Haliclona sp.*

Diante do apresentado e das propriedades estruturais discutidas, as ependiminas de esponjas marinhas surgem como promissoras em pesquisas que exploram a interação dessas proteínas com compostos hidrofóbicos, como pigmentos. Isso abre perspectivas para utilizar essas biomoléculas como transportadoras de drogas, como antibióticos, potencializando seu efeito biológico. Isso é especialmente relevante dado que drogas sintéticas, como antibióticos, frequentemente possuem características hidrofóbicas.

O presente trabalho tem por finalidade aumentar a compreensão que há a respeito das ependiminas em esponjas marinhas, abordando metodologias da química de proteína a fim de isolá-las e purificá-las, e, posteriormente, utilizar técnicas bioquímicas para caracterizá-las. A espécie escolhida para o presente trabalho, a *Amphimedon compressa*, foi selecionada tendo-se em vista a sua proximidade filogenética, por pertencer ao mesmo gênero, com a esponja marinha *A. queenslandica* a qual apresentou genes associados às ependiminas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Purificar uma proteína relacionada à ependimina (EPDR) presente na esponja marinha *Amphimedon compressa* e caracteriza-la bioquimicamente.

2.2 Objetivo específicos

- 2.2.1** Purificar uma EPDR presente na esponja *A. compressa*;
- 2.2.2** Avaliar a pureza da proteína por meio de eletroforese SDS-PAGE;
- 2.2.3** Estimar a massa molecular da EPDR por meio de SDS-PAGE e exclusão molecular;
- 2.2.4** Avaliar a estrutura secundária da proteína por dicroísmo circular;
- 2.2.5** Determinar a sequência de aminoácidos da proteína.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta da esponja

A esponja marinha *Amphimedon compressa* foi coletada manualmente por meio de mergulho com cilindro no entorno do Espigão da Rua João Cordeiro, Fortaleza-CE. A coleta dos animais foi previamente autorizada pelos órgãos ambientais competentes (SISBIO ID: 33913-12). Após a coleta, o material biológico foi transportado dentro de caixas térmicas até o laboratório e armazenado a -20 °C para utilização posterior.

3.2 Preparação do extrato

A esponja foi cortada em pequenos pedaços e macerada em água destilada na proporção 1:2 (p/v) à 25 °C, com auxílio de gral com pistilo de porcelana. A solução foi filtrada através de tecido de nylon para reter partículas maiores e, em seguida, centrifugada a 9.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sedimento foi descartado e o líquido restante foi denominado extrato bruto. A manipulação do patrimônio genético da espécie também foi previamente autorizada pelos órgãos competentes (SISGEN ID: A179FE).

3.3 Fracionamento do extrato por precipitação com sulfato de amônio

O extrato bruto foi submetido a fracionamento por solubilidade com sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), três frações foram preparadas: 0-30, 30-60 e 60-90%. Após a adição do sal cada fração foi permitida descansar por 4 horas a uma temperatura de 25 °C. Então, a amostra foi centrifugada a 9.000 x g por 30 minutos a 4 °C. Em seguida, o precipitado de cada fração foi solubilizado em água destilada e posteriormente dialisado, o sobrenadante foi utilizado para continuar o fracionamento. O extrato bruto e cada fração foram submetidos à determinação de proteínas totais solúveis pelo método de Bradford (1976), utilizando a albumina sérica humana (HSA) como proteína padrão para a confecção da curva padrão de calibração.. Além disso, as amostras tiveram sua absorbância analisada no espectro de luz visível (400 a 700 nm), com a identificação dos máximos de absorbância.

3.4 Purificação da proteína

A fração 30-60 (20 mL) foi centrifugada a 9.000 x g por 20 minutos a 4 °C, filtrada em papel filtro, para a retirada do muco que é produzido durante o fracionamento e submetida a cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel (1,0 cm x 4,0 cm), utilizando tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,6 como tampão de equilíbrio. Subsequentemente, o material não ligado (PI) foi eluído com a mesma solução de equilíbrio. As frações retidas (PII) e (PIII) foram eluídas com o tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,6 acrescido de NaCl 150 mM e 1 M, respectivamente. Os eluatos foram coletados em frações de 3 mL, as quais foram monitoradas por espectrofotometria a 280 nm. O PII e PIII foram dialisados contra água destilada e liofilizados.

O PII foi solubilizado numa concentração de 10 mg/ml em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,6 com NaCl 150mM e submetido a cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75 pg HiLoad (1,6/60 cm) acoplado ao sistema ÄKTA *pure* (GE Healthcare Life Sciences). O mesmo tampão de solubilização foi utilizado para equilíbrio da coluna e eluição. A cromatografia ocorreu ao fluxo de 1 ml/min e frações de 2 mL foram coletas, monitoradas a 280 nm. Para determinar as frações da cromatografia de exclusão molecular que continha a ependimina todas as frações coletadas referente ao PII e ao PIII foram observadas através de um gel de eletroforese SDS-PAGE. As frações mais puras correspondentes à ependimina foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas para uso posterior. A proteína purificada foi denominada AC-EPD (ependimina de *Amphimedon compressa*).

3.5 Avaliação da pureza e estimativa da massa molecular

O grau de pureza e homogeneidade da proteína foram avaliadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE), na presença e ausência de β-mercaptopetanol (LAEMMLI, 1970). O gel (12%) foi submetido a uma corrente de 25 mA e tensão de 150 V, durante 1 hora.

A massa molecular da proteína em condições desnaturantes foi estimada por meio da comparação da migração da proteína purificada com proteínas de massa molecular conhecida. Foi utilizado para comparação o marcador SigmaMarker™ - low range: Albumina (66 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), Anidrase carbônica (29kDa), Tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa), α-Lactalbumina (14.2 kDa).

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

Waters Corp.). A massa da proteína alvo foi estimada pelo tempo de eluição em comparação com proteínas de massa molecular conhecida (tiroglobulina, 669 kDa, apoferritina, 443 kDa, β -amilase, 200 kDa, álcool desidrogenase, 150 kDa, BSA, 66 kDa, anidrase do ácido carbônica e 29 kDa). A coluna foi previamente equilibrada e a cromatografia realizada em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM, monitorada a 280 nm.

3.6 Análises por Espectropolarimetria de dicroísmo circular

As análises de espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD) foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco International Co., Tóquio, Japão) conectado a um *peltier* com temperatura controlada. A proteína solubilizada em água destilada, com concentração final de 0,25 mg/mL foi disposta em uma cubeta de quartzo retangular com 5 mm de caminho óptico. Os espectros foram adquiridos no intervalo de 190 a 240 nm (far-UV), a uma velocidade de varredura de 50 nm/min, com uma largura de banda de 1 nm. A predição de estrutura secundária foi realizada pelo servidor on-line DICROWEB (WHITMORE; WALLACE, 2008).

A temperatura de melting (TM) foi calculada em função da mudança nos valores de elipticidade a 215 nm como uma função da temperatura. AC-EPD (0,25 μ M) foi submetida a temperaturas variando de 25 a 95°C com uma taxa de rampa de 3 °C/min (GREENFIELD, 2007).

3.7 Determinação da sequência de aminoácidos

Para o sequenciamento de aminoácidos, inicialmente AC-EPD foi submetida à eletroforese (SDS-PAGE-12%) conforme descrito acima. As bandas proteicas foram excisadas do gel e transferidas para microtubos de centrífuga e submetidas a redução e alquilação com DTT e IAA, respectivamente, (SHEVCHENKO *et al.*, 2007).

AC-EPD foi digerida com tripsina. As digestões foram realizadas em bicarbonato de sódio 25 mM na proporção de 1:100 p/p (enzima/substrato). A reação foi mantida a 37 °C por 16 h e interrompida com 2 μ L de ácido fórmico a 2%. (SEIDLER *et al.*, 2010; SHEVCHENKO *et al.*, 2007). Os peptídeos digeridos foram separados em uma coluna de fase reversa C18 e eluídos com um gradiente linear de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico, sendo infundidos diretamente em um espectrômetro de massa Orbitrap FusionTM TribridTM. O espectrômetro de massas operou em modo positivo na faixa de *m/z* 50 a 3000, sob tensão capilar

de 1,9 kV. As análises LC-MS/MS, realizadas com a função DDA (*Data Dependent Analysis*), utilizaram argônio como gás de fragmentação para Dissociação Induzida por Colisão.

O software MaxQuant (versão 2.6.6.0) foi empregado para análise dos arquivos brutos do DDA-MS. A busca usou como banco de dados um conjunto de sequências de ependiminas disponíveis no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information), contendo 416 entradas (Novembro de 2024). A ferramenta MaxLFQ do software MaxQuant foi usada para normalizar as intensidades dos peptídeos para quantificação sem rótulo (Tabela 1), enquanto contaminantes foram excluídos usando o banco de dados de contaminantes comum integrado ao software. O software MaxQuant também foi utilizado para a identificação dos peptídeos derivados de analise proteômica de quantificação sem rótulo.

Tabela 1 – Parâmetros usados na análise de dados DDA-MS e quantificação sem rótulo usando o software MaxQuant e MaxLFQ.

Parâmetro	Configuração
Enzima de digestão	Tripsina
Número máximo de clivagem	2
Modificação fixa	Carbamidometilação
Modificação variável	Oxidação (Metionina), Acetilação (Proteína N-terminal)
Tolerância de massa precursora	± 20 ppm
Tolerância de massa do produto	± 25 ppm
Carga máxima de peptídeo	+7
Proteína FDR	0,01
Correspondência espectral de peptídeo (PSM) FDR	0,01
Peptídeos mínimos	1
Peptídeo para quantificação de proteínas	Razor
Seleção de peptídeos para quantificação	Peptídeos não modificados e apenas os peptídeos modificados com oxidação e acetilação N terminal
Nº de peptídeos para quantificação	≥ 2

Fonte: Elaborada pelo autor. Parâmetros utilizados nas análises no software MaxQuant.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação da ependimina

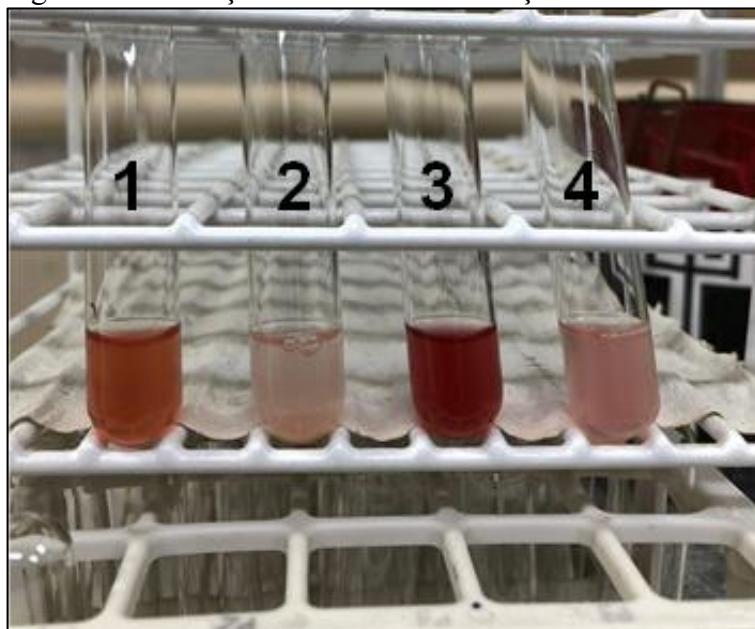
O extrato bruto da esponja marinha *A. compressa* apresentou coloração correspondente a cor primária da esponja marinha e foi submetido a um processo de fracionamento utilizando sulfato de amônio, resultando em três frações distintas: 0-30%, 30-60% e 60-90%. Entre as frações obtidas, a fração 30-60% foi a que apresentou maior similaridade com a coloração vermelha original do extrato (Figura 5).

Optou-se pelo uso de água destilada em vez de tampão salino na obtenção do extrato bruto devido a observações preliminares que demonstraram diferenças significativas na qualidade visual do extrato. Quando utilizado o tampão salino, o extrato apresentava uma coloração mais turva, e na etapa do fracionamento com sulfato de amônio da acentuava a presença de um muco, que é uma secreção natural da esponja durante o processo de fracionamento. Em contraste, a extração com água permitiu obter um extrato com coloração mais limpa e fiel à tonalidade primária da esponja, minimizando a interferência do muco.

A precipitação com sulfato de amônio foi utilizado para facilitar as etapas de purificação ao fazer a remoção de contaminantes que estavam presentes no extrato bruto. Por meio do fracionamento das proteínas totais que estavam presentes no extrato em frações com diferentes graus de solubilidade, assim, enriquecendo a fração que contém a proteína alvo e reduzindo o volume total de impurezas. Essa técnica é amplamente utilizada na purificação de proteínas em esponjas (TORRES, *et al.*, 2025).

Neste trabalho, a coloração vermelha do extrato da esponja marinha *Amphimedon compressa* foi usada como referência para os experimentos. As ependiminas, moléculas conhecidas por sua atuação na coloração externa de invertebrados marinhos, têm sido descritas em diferentes espécies. Em moluscos, por exemplo, elas influenciam a coloração da concha (JACKSON *et al.*, 2006; MANN *et al.*, 2012). Em esponjas marinhas, as ependiminas estão relacionadas à cor primária do animal, transportando os pigmentos responsáveis por essa coloração. Um exemplo disso ocorre na esponja *Haliclona sp.*, onde a ependimina demonstrou picos de absorção no espectro de luz visível, semelhante à cor do extrato, que também exibe a mesma coloração da esponja (KAWASAKI *et al.*, 2023).

Figura 5– Coloração do extrato e das frações.



Fonte: Elaborado pelo autor. Coloração do extrato bruto (1), da fração 0-30% (2), da fração 30-60% (3) e da fração 60-90% (4).

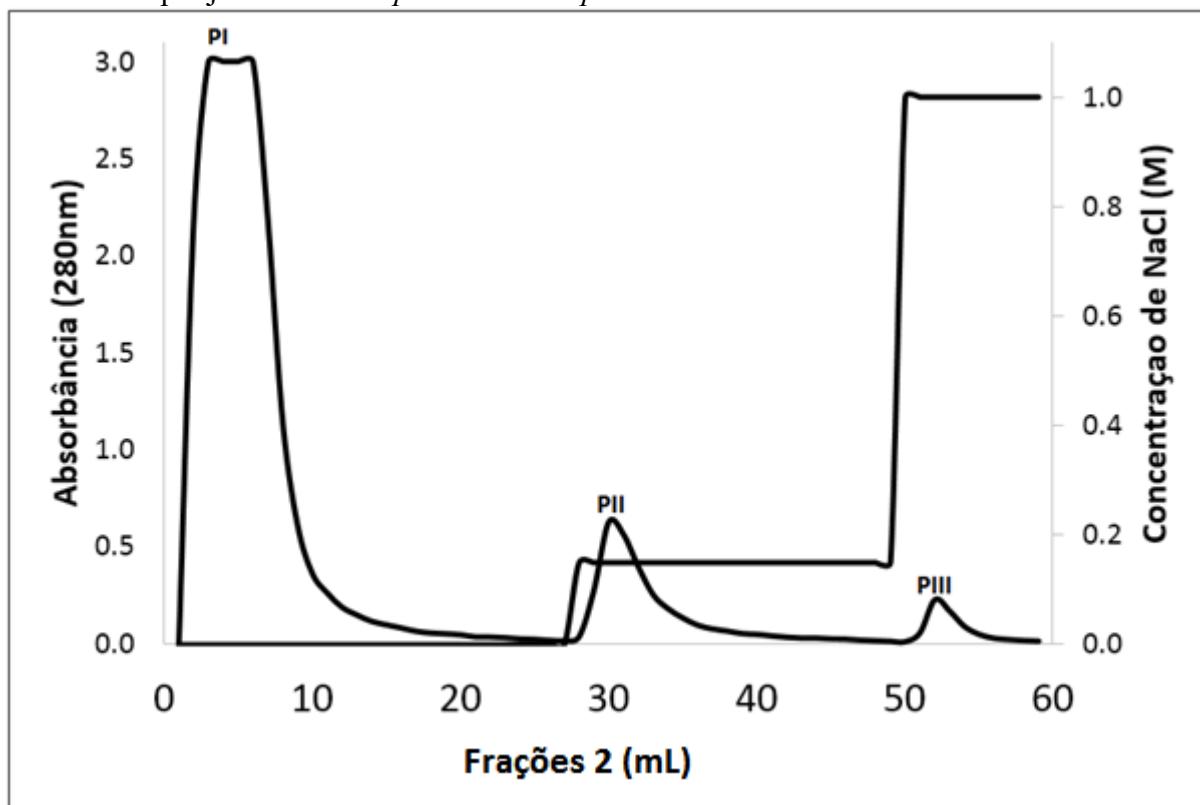
Uma ependimina presente no extrato da esponja marinha *A. compressa*, denominada AC-EPD (ependimina de *Amphimedon compresa*), foi purificada por meio de uma combinação de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica em matriz DEAE-Sephacel (Figura 6) e cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75 pg HiLoad (1,6/60cm) acoplado ao sistema ÄKTA pure (GE Healthcare Life Sciences) (Figura 7). O rendimento final da proteína purificada foi de aproximadamente 2 mg a partir de 100 g de esponja (Tabela 2), o que representou uma taxa de recuperação de apenas 0,4% das proteínas presentes no extrato.

No protocolo de purificação da AC-EPD, foi utilizada a cromatografia de troca iônica em matriz DEAE-Sephacel como o primeiro passo cromatográfico, em virtude de sua capacidade de separar as proteínas de acordo com a carga líquida da molécula. Enquanto o fracionamento por sulfato de amônio separa as proteínas do extrato bruto com base em sua solubilidade, a cromatografia de troca iônica as separa conforme sua carga em um determinado pH. Isso explica por que a matriz DEAE-Sephacel é equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, mesmo que a extração seja realizada com água destilada. A matriz deve estar no pH em que está ativada, ou seja, sua força iônica está atuante. Já a cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex foi utilizada para separar as moléculas pelo peso molecular, devido ao seu amplo alcance na separação. Nesse tipo de cromatografia, as moléculas mais pesadas serão as primeiras a eluir, seguidas pelas de menor peso molecular. No protocolo de purificação da AC-

EPD, essa técnica foi empregada para alcançar um grau de pureza maior da amostra, considerando que, até o momento, as moléculas do extrato bruto foram separadas por solubilidade, pela carga e, por fim, pelo peso molecular.

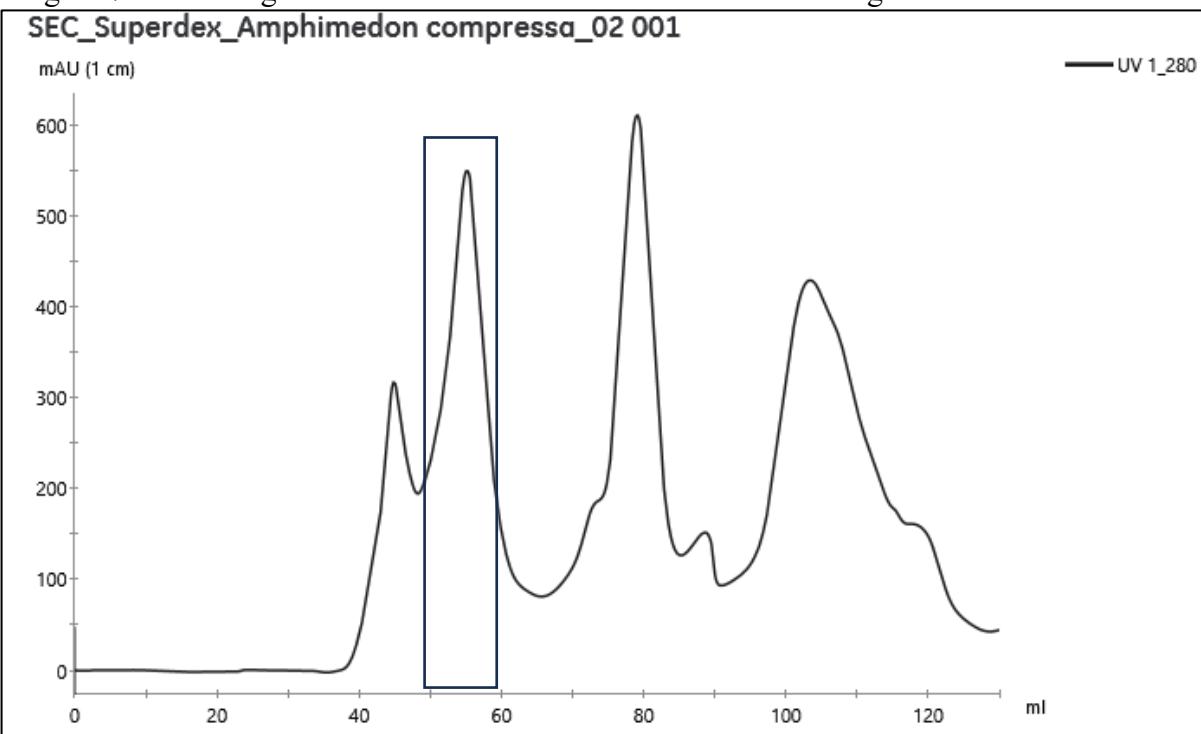
Não foi utilizada a cromatografia de interação hidrofóbica, pois, conforme observado na preparação do extrato bruto com tampão, tanto o extrato quanto as frações obtidas no fracionamento por sulfato de amônio produzem uma espécie de muco na presença de uma alta concentração salina. Ao empregar esse tipo de cromatografia no processo de purificação, a logística do experimento se complicava, uma vez que o muco gerado prejudicava o fluxo durante a cromatografia, tornando o processo muito mais lento em comparação com a cromatografia de troca iônica – chegando a levar aproximadamente o dobro do tempo necessário para finalizá-la. Além disso, as frações obtidas apresentavam um aspecto indesejado, com uma turbidez que não ocorre na cromatografia de troca iônica.

Figura 6 – Cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel da fração proteica 30-60% da esponja marinha *Amphimedon compressa*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Perfil de eluição da cromatografia de troca iônica em matriz DEAE-Sephacel. Aproximadamente 20 mL da fração 30-60 foram aplicados na coluna de cromatografia DEAE-Sephacel previamente equilibrada com Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 (1,0 cm x 4,0 cm). A coluna foi eluída em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e 1 M, PII e PIII respectivamente.

Figura 7– Cromatografia de exclusão molecular do PII da cromatografia de troca iônica.



Fonte: Elaborado pelo autor. Perfil de eluição da cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75 pg HiLoad (1,6x60cm) acoplada ao sistema AKTA pure (GE Healthcare Life Sciences). Aproximadamente 2 mL (10 mg/mL) do PII da cromatografia de troca iônica foram aplicados na coluna previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,6 com NaCl 0,15M. A coluna foi eluida com o mesmo tampão de equilíbrio. As frações (2 mL) foram analisadas por espectrofotometria a 280 nm.

Tabela 2 – Purificação de AC-EPD.

Fração	Volume (mL)	Proteínas		Rendimento (%)
		Concentração (mg/mL)	Totais (mg)	
Extrato	250	1,92	480	100
Fração 0-30%	25	0,67	16,75	3,5
Fração 30-60%	80	4,1	328	68,3
Fração 60-90%	35	1,47	51,45	10,71
AC-EPD	10	0,19	1,90	0,4

Fonte: Elaborado pelo autor.

A metodologia utilizada na purificação de AC-EPD foi diferente das metodologias observadas na literatura que estão relacionadas com a purificação de ependiminas presentes em esponjas marinhas. Na ependimina da esponja marinha *Haliclona caerulea*, foi utilizado para purificação uma combinação de cromatografias de interação hidrofóbica em matriz Phenyl-Sepharose 6B seguida de cromatografia de troca iônica em matriz DEAE-Sephacel (CARNEIRO *et al.*, 2013). Para a purificação da carotenoproteína azul foi utilizada uma sequência de cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de troca iônica utilizando

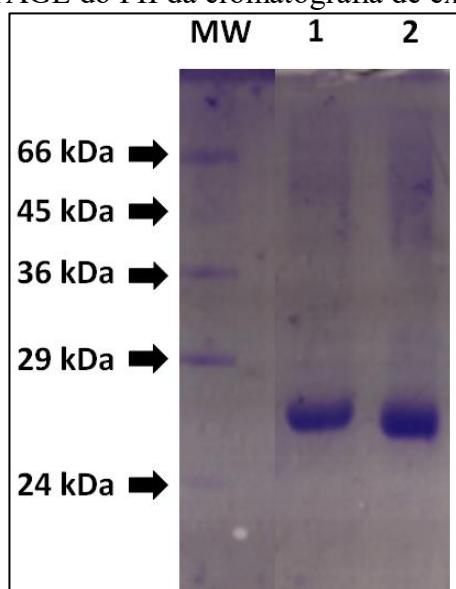
as colunas de filtração em gel HR100(GE Healthcare) e de FF DEAE Sepharose (GE Healthcare), respectivamente (KAWASAKI *et al.*, 2023). Em nenhuma dessas duas purificações registradas na literatura foi utilizado a precipitação como método de purificação.

Quando comparado o protocolo estabelecido para a purificação de AC-EPD com os observados na literatura, ele se mostra como uma alternativa para a obtenção de ependiminas em esponjas marinhas, sobretudo naquelas que apresentam a característica de produzir muco na presença de alta concentração salina. A etapa de fracionamento com sulfato de amônio auxilia as etapas posteriores de purificação ao reduzir os contaminantes presentes no extrato bruto e aumentar a concentração de ependimina na amostra (fração 30-60%), que foi utilizada nas etapas subsequentes de cromatografia. A respeito dos passos cromatográficos utilizados na purificação de AC-EPD, eles foram selecionados como alternativas ao observado na literatura, por conta que a esponja *A. compressa* apresenta características que não foram observadas nas esponjas marinhas que tiveram ependiminas purificadas, como a presença do muco gerado durante a purificação que dificulta as etapas de cromatografia já utilizadas anteriormente em trabalhos. A cromatografia de troca iônica mostrou-se uma alternativa viável ao protocolo utilizado na purificação da H-3 *lectin*, uma vez que a etapa de purificação por cromatografia de interação hidrofóbica não era viável na purificação da AC-EPD, conforme explicado anteriormente. Quando comparado com o protocolo da carotenoproteína azul, a presença do muco na *A. compressa* impossibilita seguir o protocolo estabelecido, pois, ao aplicar a amostra na cromatografia de exclusão molecular, antes de ser realizada outra etapa de cromatografia, a matriz pode ser danificada pela presença do muco, podendo até levar à sua inutilização. A ordem utilizada na purificação da AC-EPD foi definida justamente para evitar essa danificação, pois, após a etapa de purificação por cromatografia de troca iônica, quando a fração que contém a ependimina é liofilizada e posteriormente solubilizada, a amostra não apresenta mais a característica de produzir muco, permitindo que seja aplicada na cromatografia de exclusão molecular sem maiores danos à matriz.

4.2 Avaliação da pureza

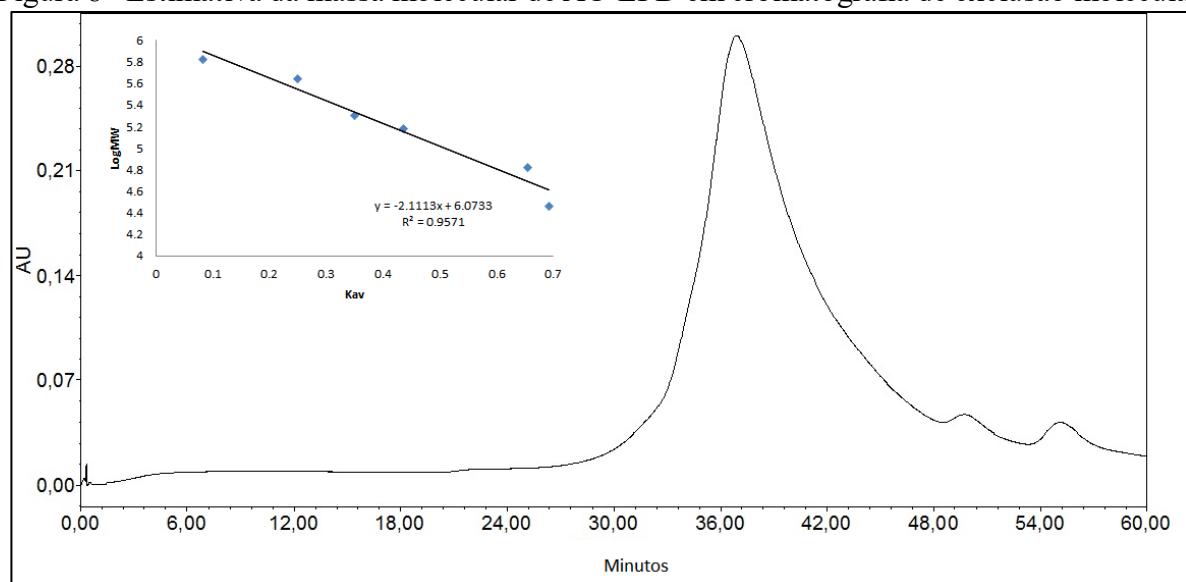
A proteína submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) revelou uma banda principal estimada em 25 kDa (Figura 8), na presença e na ausência do agente redutor. Na cromatografia de exclusão molecular, AC-EPD em condição nativa exibiu uma massa molecular de 57 kDa sugerindo que a ependimina é um dímero ligado por interações moleculares fracas (Figura 9).

Figura 7– SDS-PAGE do PII da cromatografia de exclusão molecular.



Fonte: O autor. SDS-PAGE 12%, na presença e ausência de β -mercaptanol. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. MM- marcador molecular SigmaMarkerTM - low range: Albumina (66 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa), α -Lactalbumina (14.2 kDa). 1 – PII da cromatografia de exclusão molecular na presença de β -mercaptanol. 2 – PII da cromatografia de exclusão molecular na ausência de β -mercaptanol.

Figura 8– Estimativa da massa molecular de AC-EPD em cromatografia de exclusão molecular.



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

Esse resultado difere do observado na literatura, onde a ependimina de *H. caerulea* apresenta, em SDS-PAGE, três bandas com massa relativa de 18, 16 e 9 kDa. Já a

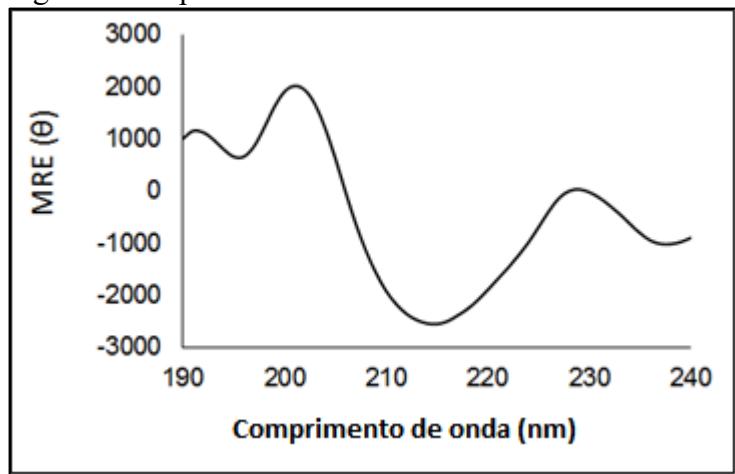
carotenoproteína azul sob condições redutoras e não redutoras apresentou uma única banda com uma massa molecular aparente de 19 kDa e 35 kDa, respectivamente (CARNEIRO *et al.*, 2013; KAWASAKI *et al.*, 2023).

A AC-EPD apresentou massas moleculares estimadas em 25 kDa em condição desnaturada e 57 kDa em condição nativa, não demonstrando mudanças significativas entre as condições redutiva e não redutiva no gel de eletroforese SDS-PAGE. Essas características contrastam com o observado na literatura sobre as ependiminas de esponjas, pois a massa molecular apresentada é muito maior do que a normalmente observada, o que pode indicar que a AC-EPD possui uma estrutura tridimensional diferente das demais ependiminas de esponjas.

4.3 Análise por dicroísmo circular

Os espectros adquiridos por dicroísmo circular revelaram que a AC-EPD possui duas bandas positivas em torno de 200 e 190 nm, além de uma banda negativa com mínimo entre 220 e 210 nm, característica intrínseca de proteínas com estruturas predominantes do tipo β (Figura 10). A predição de estrutura secundária realizada pelo servidor *on-line* DICROWEB mostrou que a proteína é composta por 4% de alfa hélice, 42% por folhas betas, 22% por voltas betas e 32% por alças.

Figura 9 – Espectros de dicroísmo circular de AC-EPD.

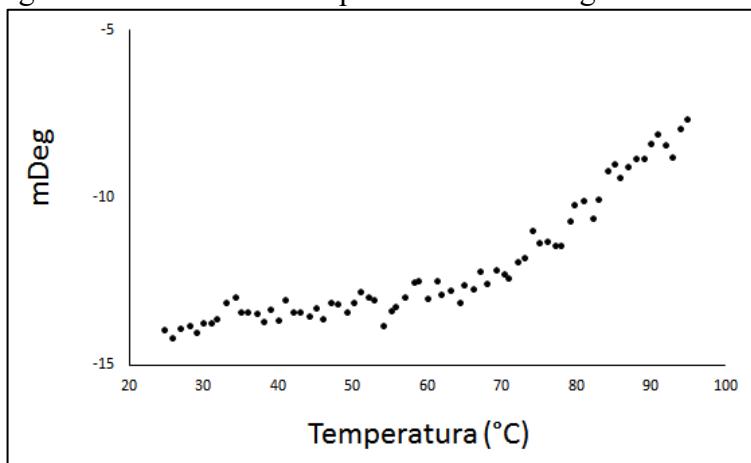


Fonte: Elaborado pelo autor. Espectro de dicroísmo circular de AC-EPD (Far – UV; 190 a 240 nm).

De forma semelhante, as ependiminas já descritas posuem sua constituição majoritariamente formada por folhas betas. Por exemplo, a ependimina EPDR1 humana e de camundongo são formadas por onze fitas organizadas em duas folhas antiparalelas,

acompanhadas de duas α -hélices. Essas estruturas betas circundam o bolsão hidrofóbico (PARK *et al.*, 2019; McDougall *et al.*, 2018). A temperatura de Melting (Tm) da proteína foi analisada. O experimento mostrou que em 79,18°C metade das proteínas estão enoveladas e metade desnaturadas (Figura 11). Demonstrando que essas proteína elas são termoestáveis até aproximadamente 80°C.

Figura 10— Análise da temperatura de Melting da AC-EPD



Fonte: Elaborado pelo autor. Espectro de dicroísmo circular de AC-EPD, 0,25 μ M, com variação de temperatura de 25 a 95°C com uma taxa de rampa de 3 °C/min. A TM foi calculado em função da mudança nos valores de elipticidade a 215 nm como uma função da temperatura.

4.4 Determinação da sequência de aminoácidos

Foram identificados 27 peptídeos de AC-EPD através do programa MaxQuant (Tabela 3), derivados de análise proteômica de quantificação sem rótulo, que são relacionados com sequências de ependiminas de diferentes organismos. Dentre os peptídeos observados três corresponderam com sequências de ependiminas de esponjas marinhas, dois peptídeos foram correlatos com a proteína prevista do gene da esponja marinha *Sycon ciliatum* e um correspondeu com a cadeia beta da ependimina carotenoproteína azul (Tabela 4). Os resultados obtidos contribuem para afirmar que a proteína purificada AC-EPD pertence à família das ependiminas. Entretanto, não foi possível a confecção do mapa peptídico.

Tabela 2 – Sequências de peptídeos obtidas pelo MaxQuant

Sequência	Massa		Δ (Da)
	Calculada	Observada	
MFATIVLFVSICLTSRAPHHQHCHSPNMTGLMRVMTLK	4583.31	4583.23	0.08
MFDPAQGHEFYVNGDYHYDKTGMR	2877.09	2877.23	-0.14
TGMRKAR	818.49	818.45	0.04
SPNMTGYVSVMGQR	1525.66	1525.70	-0.04
ADFHPMGIPKTAGLLQAVVGSSSGPGQGLLVNTWMGDLPDK			
QGK	4531.47	4531.30	0.17
FLASIHAGSSSIEGEGLK	1801.97	1801.92	0.05
RALVLLACFSACFSACCLAQR	2473.19	2473.19	0.01
LEETETPR	973.46	973.47	-0.02
APPYLEGKLLVVSPEGK	1796.15	1796.01	0.14
NASLLGQVIGSSSGPGQGLLVNTWGELQMK	3196.80	3196.66	0.14
NASLLAQSVLGSSSGPGQGLLVNSWVGDLDPK	3165.77	3165.63	0.13
QNHEACDKR	1156.44	1156.50	-0.07
MKTGSAK	721.39	721.38	0.01
LLLLQDNHTTYRDTLLYKEGIAYK	2995.71	2995.57	0.15
MMKMMKPLLGLCWVLVVLVLTGR	3013.04	3012.73	0.31
TFVLLMCLAVGCLAQAPHPGSPPLTGAMSVANEKVNAYAK	4456.36	4456.22	0.13
KALQATYHPFALPSNAVFQSR	2345.34	2345.23	0.11
KLDMDLNPLDIPDDAKFHSTITAGSR	2869.50	2869.43	0.07
IALTEAWDPFDIPKNSTFEDQYIIGGPGDNVEVQEWSDRK	4579.22	4579.18	0.04
LAFMAFYLDVSLFTGFFSLLAFMTR	2907.57	2907.47	0.10
YFGVYTVVGCIPIQEEFYSRR	2582.30	2582.26	0.03
ISYDAINRR	1106.62	1106.58	0.03
DDTTAWGEFDYDSSNKFLRFVEDSSK	3058.25	3058.35	-0.10
MRLLVLTCLLAVCLAQKPHPCSSPPLTGFSVSTQNEK	4352.46	4352.25	0.21
IDLTEAWDPFDIPKNSTYEDQYFIGGPGDNVEVQEWSDR	4544.98	4545.06	-0.07
TELLLYKTK	1107.76	1107.65	0.10

Fonte: Elaborado pelo autor. Peptídeos obtidos após análise no programa MaxQuant. Δ : massa calculada – massa observada.

Tabela 3 – Organismos correspondente aos peptídeos obtidos na análise no MaxQuant

Seqüência	ID Proteico	Organismo de referência
MFATIVLFVSICLTSRAPHHQHCHSPNMTGLMRVMTLK	XP_015816479. 2	<i>Nothobranchius furzeri</i>
MFDPAQGHEFYVNGDYHYDKTGMR	CAH0803336.1	<i>Sycon ciliatum</i>
TGMRKAR	CAH0803336.1	<i>Sycon ciliatum</i>
SPNMTGYVSVMGQR	XP_061607729. 1	<i>Phyllopteryx taeniolatus</i>
ADFHPMGIPKTAGLLQAVVGSSSGPGQGLLVNTWMGDLPDK	XP_053272496. 1	<i>Pleuronectes platessa</i>
QGK	XP_062289094. 1	<i>Scomber scombrus</i>
FLASIHAGSSSIEGEGLK	XP_024144331. 1	<i>Oryzias melastigma</i>
RALVLLACFSACFSACCLAQR	XP_035492465. 1	<i>Crepidula fornicata</i>
LSQVVQLQYEFVQLAINHQTNQMVKILYER	UTK45820.1	<i>Scophthalmus maximus</i>
LEETETPR	XP_066502303. 1	<i>Hoplias malabaricus</i>
APPYLEGKLLVVSPEGK	ACQ58983.1	<i>Anoplopoma fimbria</i>
NASLLGQVVGSSSGPGQGLLVNTWGELQMK	XP_028419845. 1	<i>Perca flavescens</i>
NASLLAQSVLGSSSGPGQGLLVNSWVGDLDPK	JAQ52542.1	<i>Fundulus heteroclitus</i>
QNHEACDKR	XP_005455254. 1	<i>Oreochromis niloticus</i>
MKTGSAK	XP_041707479. 1	<i>Coregonus clupeaformis</i>
LLLDQDNHTTYRDTLLLYKEGIAYK	XP_052459354. 1	<i>Carassius gibelio</i>
MMKMMKPLLGLCWVLVLVLVLVTGR	ACM09231.1	<i>Salmo salar</i>
TFVLLMCLAVGCLAQAPHPGSPPLTGAMSVANEKVNAYAK KALQATYHPFALPSNAVFQSR	XP_054610331. 1	<i>Dunckerocampus dactyliophorus</i>
KLDMDLNPLDIPDDAKFHSTITAGSR	XP_061596904. 1	<i>Cololabis saira</i>
IALTEAWDPFDIPKNSTFEDQYIIGGPBDNVEVQEWSDRK	JAQ65551.1	<i>Fundulus heteroclitus</i>
LAFMAFYLDVSLFTGFFSLLAFMTR YFGVYTVVGCIPIQEEFYSSRR	KAG8006289.1 KAI8479987.1	<i>Nibea albiflora</i> <i>Branchiostoma belcheri</i>
ISYDAINRR	KAI8486654.1	<i>Branchiostoma belcheri</i>
DDTTAWGEFDYDSSNKFLRFVEDSSK	XP_053341197. 1	<i>Clarias gariepinus</i>
MRLLVLTCLLAVCLAQKPHPCSSPPLTGSFSVSTQNEK	TKS92622.1	<i>Collichthys lucidus</i>
IDLTEAWDPFDIPKNSTYEDQYFIGGPBDNVEVQEWSDR	MEQ2312380.1	<i>Ameca splendens</i>
TELLLYKTK	pdb 8I34 B	<i>Haliclona sp.</i>

Fonte: Elaborado pelo autor. ID das sequências fasta extraídas do banco de dados NCBI utilizadas na análise no programa MaxQuant e o organismo a qual essas sequências estão relacionadas. Os peptídeos correspondem com sequências de ependiminas de esponjas marinhas estão em negrito.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou, com êxito, a viabilidade de isolar e caracterizar uma proteína relacionada à ependimina (EPDR) a partir da esponja marinha *Amphimedon compressa*. Através de um protocolo que integrou extração do material biológico, fracionamento por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel e cromatografia de exclusão molecular, foi possível purificar a proteína AC-EPD. A análise por SDS-PAGE revelou uma massa de aproximadamente 25 kDa em condições desnaturadas e de 57 kDa em seu estado nativo, sugerindo a formação de dímeros estabilizados por interações não covalentes. Complementarmente, os espectros de dicroísmo circular evidenciaram uma estrutura secundária predominantemente beta, enquanto o sequenciamento por LC-MS/MS confirmou a relação da proteína com ependiminas de outras espécies.

Esses achados não apenas comprovam a eficiência do protocolo adotado, mas também abrem novas perspectivas para o uso das EPDRs como transportadoras de moléculas hidrofóbicas, contribuindo para o avanço da bioprospecção de recursos naturais em esponjas marinhas e para o desenvolvimento de potenciais aplicações biotecnológicas e farmacêuticas.

REFERÊNCIAS

- ALBRIZIO, S. *et al.* Amphitoxin, a new high molecular weight antifeedant pyridinium salt from the Caribbean sponge *Amphimedon compresa*. **Journal of natural products**, v. 58, n. 5, p. 647–652, 1995.
- APOSTOLOPOULOS, J. *et al.* Identification and characterization of a novel family of mammalian ependymin-related proteins (MERPs) in hematopoietic, nonhematopoietic, and malignant tissues. **DNA and cell biology**, v. 20, n. 10, p. 625–635, 2001.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRUSCA, R. C.; MOORE, W.; SHUSTER, S. M. **Invertebrados**. 3º edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.
- CALADO, R. *et al.* Updated trends on the biodiscovery of New Marine Natural Products from Invertebrates. **Marine drugs**, v. 20, n. 6, p. 389, 2022.
- CARBALLEIRA, N. M.; NEGRÓN, V.; REYES, E. D. Novel Monounsaturated Fatty Acids from the Sponges *Amphimedon compresa* and *Mycale laevis*. **Journal of natural products**, v. 55, n. 3, p. 333–339, 1992.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: purification and mass spectrometric characterization. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 12, p. 2864–2873, 2013.
- DE VOOGD, *et al.* World Porifera Database. 2025. Disponível em: <https://www.marinespecies.org/porifera> . Acesso em 09 jan. 2025.
- DESQUEYROUX-FAÚNDEZ, R.; VALENTINE, C. Family Niphatidae Van Soest, 1980. In: HOOPER, J. N. A.; VAN SOEST, R. W. M. (Eds) **Systema Porifera: A guide to the Classification of Sponges** . v. 1. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. p. 874–890.
- FRANSOZO, ADILSON. **Zoologia dos Invertebrados**/Adilson Fransozo, Maria Lucia Negreiros-Fransozo – 1. ed. – [Reimpr.]. – Rio de Janeiro: Roca, 2017. il.
- GANSS, B.; HOFFMANN, W. Calcium binding to sialic acids and its effect on the conformation of ependymins. **European journal of biochemistry**, v. 217, n. 1, p. 275–280, 1993.
- GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2527–2535, 2006.
- GREGORIO-KING, C. C. *et al.* MERPI: a mammalian ependymin-related protein gene differentially expressed in hematopoietic cells. **Gene**, v. 286, n. 2, p. 249–257, 2002.

- HALL, M. R. *et al.* The crown-of-thorns starfish genome as a guide for biocontrol of this coral reef pest. **Nature**, v. 544, n. 7649, p. 231–234, 2017.
- HELMY, T.; VAN SOEST, R. W. M. *Amphimedon* species (Porifera: Niphatidae) from the Gulf of Aqaba, Northern Red Sea: Filling the gaps in the distribution of a common pantropical genus. **Zootaxa**, v. 859, n. 1, p. 1, 2005.
- HICKMAN, C.P; ROBERTS, L.S; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 846 p, 2004.
- HOFFMANN, W.; SCHWARZ, H. Ependymins: meningeal-derived extracellular matrix proteins at the blood-brain barrier. **International review of cytology**, v. 165, p. 121–158, 1996.
- JACKSON, D. J. *et al.* A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. **BMC biology**, v. 4, n. 1, p. 40, 2006.
- KAWASAKI, S. *et al.* An ependymin-related blue carotenoprotein decorates marine blue sponge. **The journal of biological chemistry**, v. 299, n. 9, p. 105110, 2023.
- KUBOTA, T. *et al.* Zamamidine D, a Manzamine Alkaloid from an Okinawan *Amphimedon* sp. Marine Sponge. **Journal of natural products**, v. 80, n. 4, p. 1196–1199, 2017.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LAUBENFELS, M. W. A discussion of the sponge fauna of the Dry Tortugas in particular, and the West Indies in general, with material for a revision of the families and orders of the Porifera. **Papers of the Tortugas Laboratory**, v. 30, n. 467, p. 1–225, 1936.
- MANN, K.; EDSINGER-GONZALES, E.; MANN, M. In-depth proteomic analysis of a mollusc shell: acid-soluble and acid-insoluble matrix of the limpet *Lottia gigantea*. **Proteome science**, v. 10, n. 1, p. 28, 2012.
- MARIE, B. *et al.* Proteomic analysis of the organic matrix of the abalone *Haliotis asinina* calcified shell. **Proteome science**, v. 8, n. 1, p. 54, 2010.
- MCDougall, C. *et al.* The evolution of ependymin-related proteins. **BMC evolutionary biology**, v. 18, n. 1, p. 182, 2018.
- MURAEVA, O. A. *et al.* Mechanisms of adaption to salinity stress in marine gastropods *Littorina saxatilis*: a proteomic analysis. **Cell and tissue biology**, v. 10, n. 2, p. 160–169, 2016.
- NIMMRICH, I. *et al.* The novel ependymin related gene UCC1 is highly expressed in colorectal tumor cells. **Cancer letters**, v. 165, n. 1, p. 71–79, 2001.
- PAPON, N; COPP, B.R.; COURDAVVAULT, V. Marine drugs: Biology, pipelines, current and future prospects for production. **Biotechnol Adv**. [s.l]. 2022; 54:107871.

- PARK, J. K. *et al.* Structures of three ependymin-related proteins suggest their function as a hydrophobic molecule binder. **IUCrJ**, v. 6, n. Pt 4, p. 729–739, 2019.
- PECHENIK, J. A. **Biologia dos invertebrados** – 7. ed. – Porto Alegre: AMGH, 2016.
- SCHMIDT, R. Cell-adhesion molecules in memory formation. **Behavioural brain research**, v. 66, n. 1–2, p. 65–72, 1995.
- SEIDLER, J. *et al.* De novo sequencing of peptides by MS/MS. **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 634–649, 2010.
- SHASHOUA, V. E. The role of brain extracellular proteins in neuroplasticity and learning. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 5, n. 1–2, p. 183–207, 1985.
- SHASHOUA, V. E. Ependymin, a brain extracellular glycoprotein, and CNS plasticity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 627, n. 1, p. 94–114, 1991.
- SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2007.
- SOEST, R. W. M. Marine Sponges from Curaçao and other Caribbean Localities Part II Haplosclerida. **Studies on the Fauna of Curaçao and other Caribbean Islands**, v. 62, p. 1–173, 1980.
- SONG, Q. *et al.* Toxic responses of *Perna viridis* hepatopancreas exposed to DDT, benzo(a)pyrene and their mixture uncovered by iTRAQ-based proteomics and NMR-based metabolomics. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 192, p. 48–57, 2017.
- SUÁREZ-CASTILLO, E. C. *et al.* Ependymin, a gene involved in regeneration and neuroplasticity in vertebrates, is overexpressed during regeneration in the echinoderm *Holothuria glaberrima*. **Gene**, v. 334, p. 133–143, 2004.
- THOMPSON, M. N. *et al.* Bioactivity of amphitoxin, the major constituent of the Jamaican sponge *Amphimedon compressa*. **Chemistry & biodiversity**, v. 7, n. 8, p. 1904–1910, 2010.
- TORRES, R. C. F. *et al.* Structural insights and antimicrobial synergy of a proto-galectin from the marine sponge *Aiolochroia crassa*. Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology, v. 275, n. 111034, p. 111034, 2025.
- TSUKAMOTO, S. *et al.* Hachijodines A-G: seven new cytotoxic 3-alkylpyridine alkaloids from two marine sponges of the genera *Xestospongia* and *Amphimedon*. **Journal of natural products**, v. 63, n. 5, p. 682–684, 2000.
- WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392–400, 2008.
- WIEDENMAYER, F. Shallow-Water Sponges of the Western Bahamas. **Experimentia Supplementa (Birkhäuser)**, v. 28, p. 1–287, 1977.

XU, N. J.; SUN, X.; YAN, X. J. A new cyclostellettamine from sponge *Amphimedon compressa*. **Zhongguo hua xue kuai bao [Chinese chemical letters]**, v. 18, n. 8, p. 947–950, 2007.