

# Estudo das vias envolvidas na síntese de nucleotídeos no platelminto parasitos *Echinococcus spp.* e sua relevância para a identificação de novos alvos para o controle parasitário

Marcelo Pasa Panesso; Henrique Bunselmeyer Ferreira (orientador) \*

Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional e Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

\* Este trabalho teve também a participação do pós-doutorando Martin Cancela Sehabiague.

## Introdução:

A fase larval (metacésteo ou cisto hidático) do *Echinococcus granulosus* (Figura 1) é o agente etiológico da equinococose cística, uma zoonose crônica endêmica no cone sul da América do Sul, incluindo o sul do Brasil (1). A equinococose cística é, no Brasil, uma das cestodíases mais importantes, juntamente com a cisticercose, causada por *Taenia solium*. A eficiência dos tratamentos atuais da equinococose é ainda limitada, havendo necessidade de novos fármacos anti-helmínticos e estratégias terapêuticas mais eficientes. Estudos prévios (2) apontaram as enzimas das vias de síntese de nucleotídeos como potenciais alvos para desenvolvimento de fármacos, devido ao seu papel na síntese e reparo de DNA. Entre os alvos identificadas estão a enzima ribonucleotídeo-redutase (RNR), envolvida na síntese de novo de desoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeos, e as enzimas da via de salvação, que permitem a captação de nucleosídeos do meio.

## Objetivo:

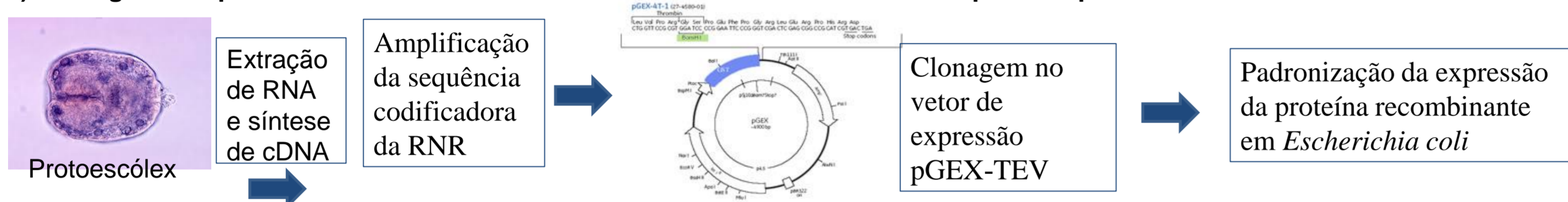
O presente trabalho buscou avaliar enzimas envolvidas na síntese de nucleotídeos como potenciais alvos para controle parasitário.

## Metodologia:

### 1) Avaliação *in vitro* do efeito dos inibidores da enzima RNR

Protoescólices (pré-adultos; Figura 1) de *E. granulosus* foram cultivados em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino na presença de diferentes concentrações de dois inibidores da RNR, a hidróxi-ureia (HU) e o COH29 durante, e os cultivos foram acompanhados para determinação da taxa de mortalidade dos indivíduos cultivados.

### 2) Clonagem e expressão da subunidade maior da RNR (RNR Is) no vetor de expressão pGEX-TEV:



A subunidade menor da RNR (RNR ss) já tinha tido sua sequência codificadora clonada e expressa em *E. coli* para produção da cadeia polipeptídica recombinante correspondente. A expressão da RNR Is complementarizará este trabalho, permitindo a produção da subunidade maior da enzima e a reconstituição da enzima dimérica funcional recombinante para a realização de ensaios de atividade *in vitro*, incluindo ensaios para avaliação de atividade inibitória.

### 3) Análise *in silico* para identificação da via de salvação de nucleotídeos.

Devido a sua importância para a síntese de nucleotídeos e seu potencial como alvo para tratamento foi realizada a identificação de enzimas da via de salvação em *E. granulosus*

Foi utilizada a sequência completa do genoma de *E. granulosus* (2) disponível em bancos de dados públicos (<https://parasite.wormbase.org/index.html>) e algoritmos BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para identificar genes ortólogos aos que codificam proteínas da via de salvação de nucleotídeos de mamíferos.

## Resultados:

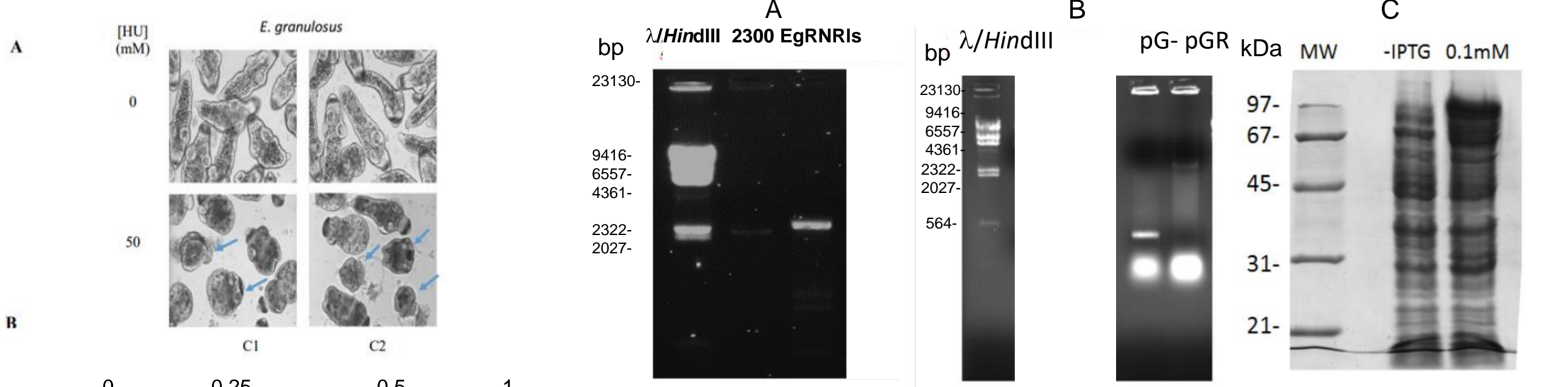


Figura 3 Clonagem e expressão da subunidade maior da RNR no vetor de expressão pGEX. A) Amplificação da sequência codificadora (CDS) da RNR Is (EgRNRIs) a partir de cDNA de protoescólices. B) Clonagem por recombinação *in vivo* da CDS RNR Is. C) Expressão recombinante na linhagem de *E. coli* BL21 Star. pG-: vetor sem a inserção pGR: vetor contendo a RNR

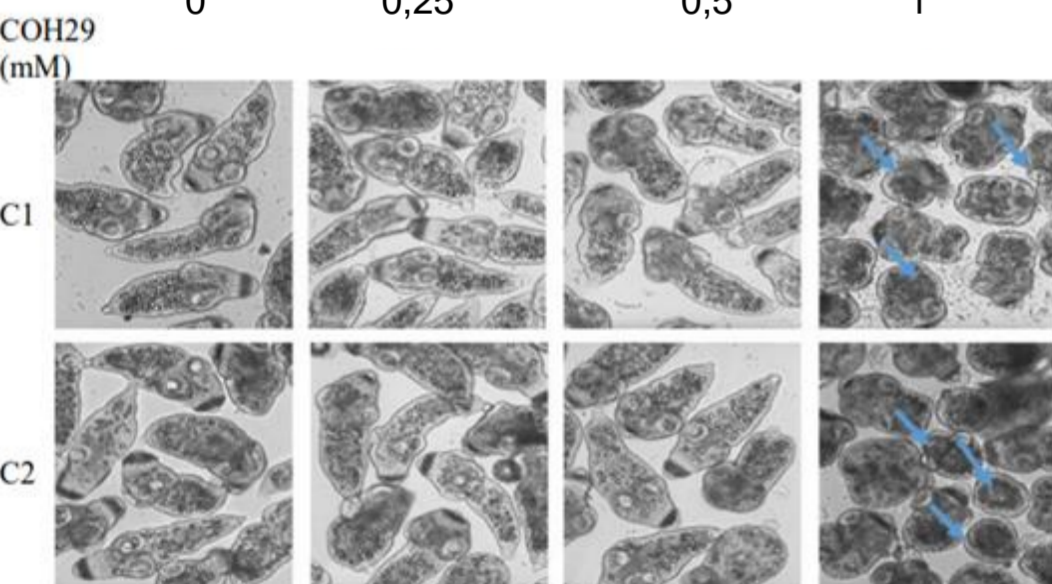


Figura 2. Efeito de inibidores da enzima ribonucleotídeo-redutase em protoescólices de *E. granulosus*. A) Efeito da incubação de PEs com HU 50 mM após 48 h. B) Efeito da incubação de PEs com 0,25 mM, 0,5 mM e 1 mM de COH29 após 96h. As setas indicam a presença de protoescólices mortos nas condições analisadas. O cultivo foi interrompido quando foi constatada a morte dos protoescólices.

## Conclusões:

Foi observada a mortalidade de protoescólices após o tratamento com os inibidores da enzima RNR HU e COH29, reforçando o potencial da enzima como alvo anti-parasitário.

Foi realizada a clonagem e expressão da subunidade maior da RNR de *E. granulosus*, que posteriormente será utilizada para a reconstituição da enzima *in vitro*.

Foram identificados genes de *E. granulosus* ortólogos aos que codificam enzimas da via de salvamento de nucleotídeos em mamíferos, essas enzimas serão posteriormente avaliadas como alvos para tratamento.

## Perspectivas:

Purificação da subunidade maior da RNR e reconstituição da enzima recombinante dimérica *in vitro*.

Padronização de um ensaio enzimático de atividade e de inibição com a enzima dimérica reconstituída de *E. granulosus* recombinante.

Análise da funcionalidade da via de salvação de nucleosídeos e seu potencial como alvos anti-parasitários.

## Referencias Bibliográficas:

(1)Pavletic CF, et al. (2017) "Cystic echinococcosis in South America: a call for action." Rev Panam Salud Publica. 41:e42..

(2)Tsai, I. et al. (2013). "The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism". Nature 496:57-63.

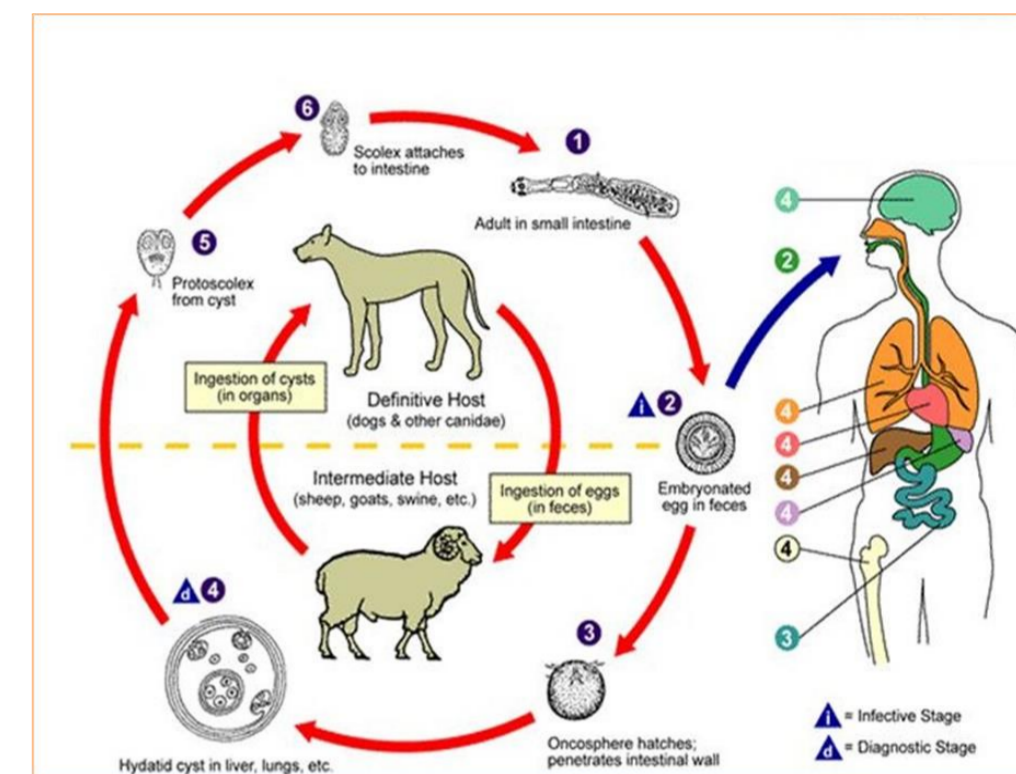


Figura 1: Ciclo de vida do *E. granulosus*

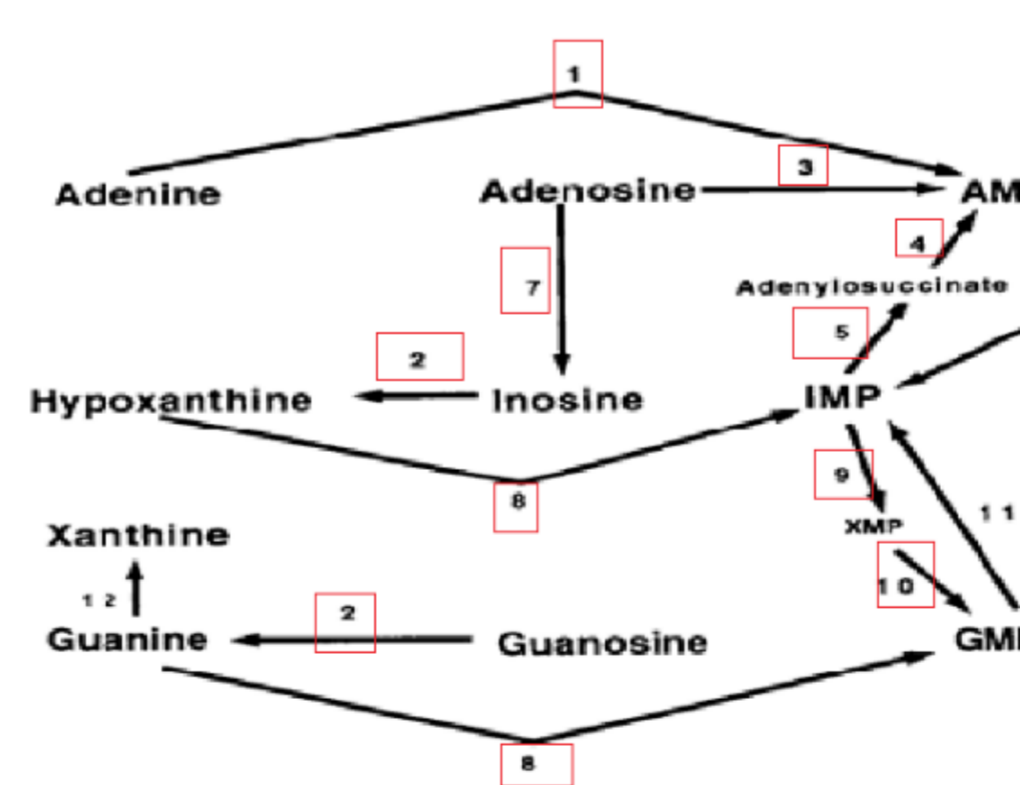


Figura 4. Análise *in silico* das proteínas da via de salvação de nucleotídeos identificadas em *E. granulosus*. O retângulo vermelho mostra as enzimas ortólogas de mamíferos identificadas em *E. granulosus*. As enzimas cujos nomes estão destacados já haviam sido incluídas entre os vinte alvos mais promissores para desenvolvimento de fármacos em outra espécie do mesmo gênero, *Echinococcus multilocularis* (2).

### Enzimas da via de salvage

- 1) Adenina-fosforibosiltransferase
- 2) Purina-nucleosídeo-fosforilase
- 3) Adenosino-cinase
- 4) Adenilossuccinato-liase
- 5) Adenilossuccinato-sintetase
- 6) AMP-deaminase
- 7) Adenosino-deaminase
- 8) Hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase
- 9) IMP-desidrogenase
- 10) GMP-sintetase
- 11) GMP-redutase
- 12) Guanino-deaminase