

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Bacharelado em Ciências Biológicas**

Trabalho de Conclusão de Curso

Modelagem estrutural e estudos de *docking* da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase e análise *in vitro* do efeito da sinvastatina na viabilidade de *Mesocestoides corti*

**Marina Monteiro Guedes
Orientador: Arnaldo Zaha**

Porto Alegre, julho de 2019

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Bacharelado em Ciências Biológicas**

Trabalho de Conclusão de Curso

Modelagem estrutural e estudos de *docking* da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase e análise *in vitro* do efeito da sinvastatina na viabilidade de *Mesocestoides corti*

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Marina Monteiro Guedes
Orientador: Arnaldo Zaha**

Porto Alegre, julho de 2019

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof^o Dr. Arnaldo Zaha, por ter me dado à oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela dedicação e orientação deste trabalho.

Ao Jeferson, que me ajudou desde o início, por toda dedicação e pela paciência em tentar esclarecer minhas dúvidas no desenvolvimento deste trabalho, mas principalmente por todo o carinho e amizade que se desenvolveu durante este tempo que trabalhamos juntos.

Aos colegas de laboratório, em especial à Edileuza, que esteve sempre disposta a me ajudar e a esclarecer dúvidas no desenvolvimento do projeto.

À minha família, minha mãe Edite e a minha irmã Tatiana, que sempre me apoiaram e incentivaram desde o início. À minha prima Luciana e a minha tia Lurdes, pelo apoio nos momentos difíceis. E especialmente para a minha mãe, por acreditar em mim, sempre apoiar as minhas decisões e por ter me dado todo o suporte necessário para que eu pudesse concluir uma das etapas mais importantes da minha vida.

Aos meus amigos, Raquel, Franciely, Aline, Clara, Daniel, Ludy e a Kassiane, pelo companheirismo durante esses anos, por todo o apoio e amizade que foram essenciais para minha formação. Em especial, à Franciely pela amizade que cultivamos desde o início e pela paciência nos momentos difíceis da graduação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Características gerais de cestódeos	7
1.2. Doenças causadas por cestódeos.....	7
1.3. Reposicionamento de fármacos e <i>docking</i> molecular	9
1.4. Estatinas e a enzima HMG-CoA redutase.....	9
1.5. <i>M. corti</i> como organismo-modelo.....	11
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVO	13
3.1. Objetivo geral	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1. Análise <i>in silico</i> de conservação da sequência de aminoácidos da enzima HMG-CoA redutase	14
4.2. Modelagem comparativa e <i>docking</i> molecular da enzima HMG-CoA redutase de <i>M. corti</i>	14
4.3. Manipulação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>M. corti</i>	15
4.4. Avaliação <i>in vitro</i> dos efeitos da sinvastatina em tetratídeos de <i>M. corti</i>	15
4.5. Coloração de tetratídeos com eosina	15
5. RESULTADOS	16
5.1. Conservação da enzima HMG-CoA redutase	16
5.2. Estrutura tridimensional da enzima HMG-CoA redutase de <i>M. corti</i>	17
5.3. Avaliação <i>in vitro</i> dos efeitos da sinvastatina em tetratídeos de <i>M. corti</i>	22
5.4. Coloração de tetratídeos	23
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	25
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

RESUMO

Cestódeos são endoparasitos obrigatórios, capazes de infectar uma grande diversidade de animais, sendo facilmente transmitidos entre os hospedeiros. Estes organismos causam doenças (cestodíases), afetando tanto o homem como animais domésticos, sendo de impacto médico e econômico, e constam na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde. A principal forma de tratamento é pelo uso de drogas antiparasitárias, como os benzimidazóis. Contudo, estes fármacos apresentam limitações quanto à efetividade do tratamento e restrições de aplicação associadas a efeitos colaterais, podendo favorecer o desenvolvimento de resistência. Assim, existe a necessidade de identificar formas terapêuticas mais eficientes para o tratamento das cestodíases. As estatinas são fármacos usados para controlar a hipercolesterolemia por meio da inibição da enzima hidroximetilglutaril-CoA-redutase (HMG-CoA redutase), envolvida na síntese de colesterol pela via do mevalonato. Os cestódeos apresentam a via do mevalonato, mas sem o ramo que leva à síntese de colesterol e, dessa forma, são dependentes da captação do colesterol do hospedeiro. Já foi demonstrado em diferentes organismos que após inibição da HMG-CoA redutase, existe uma redução na prenilação de proteínas, parada do crescimento, esterilidade e letalidade. Desta forma, a enzima HMG-CoA redutase surge como um potencial alvo terapêutico. Com o intuito de buscar novas alternativas para o tratamento de doenças causadas por cestódeos, o presente trabalho utiliza como estratégia de ação o reposicionamento de fármacos. A enzima HMG-CoA redutase é altamente conservada em diferentes cestódeos e a modelagem comparativa da estrutura tridimensional da enzima HMG-CoA redutase de *M. corti* (McosHMG8) revelou uma organização estrutural similar a outras HMG-CoA redutases e conservação do domínio catalítico da enzima. As análises computacionais de *docking* molecular mostraram que a sinvastatina interage com McosHMG8 por meio de três ligações de hidrogênio, um número menor de interações que a enzima HMG-CoA redutase humana, que interage por meio de oito ligações de hidrogênio. Os efeitos da sinvastatina em tetratirídeos de *M. corti*, nas concentrações de 50 µM, 100 µM e 150 µM por até 120 h de tratamento mostraram que os tetratirídeos começam a perder mobilidade a partir de 72 h de tratamento nas concentrações de 100 µM e 150 µM. Com 120 h de tratamento de sinvastatina, os tetratirídeos apresentaram sinais de degradação, como a formação de bolhas no tegumento do parasito. Estes resultados mostram que nas concentrações testadas (50 µM, 100 µM e 150 µM) a sinvastatina pode estar diminuindo a viabilidade do parasito. Análises computacionais de *docking* são necessárias para melhorar a predição da forma de interação da sinvastatina com McosHMG8, assim como ensaios mais específicos para quantificar a mobilidade e a viabilidade dos tetratirídeos durante o tratamento com a sinvastatina.

Palavras-chave: *M. corti*, reposicionamento de fármacos, sinvastatina, *docking*, cestódeos.

ABSTRACT

Cestodes are obligate endoparasites, capable of infecting a large diversity of animals and easily transmitted between hosts. These organisms cause diseases (cestodiasis) affecting both humans and domestic animals, with medical and economic impact, and are included in the list of Neglected Tropical Diseases of the World Health Organization. Antiparasitic drugs, such as benzimidazoles, are the main form of treatment, however, these drugs present limitations on the effectiveness of treatment and application restrictions associated with side effects and may favor the development of resistance. Thus, identify more efficient therapeutic forms for the treatment of cestodiasis is needed. Statins are drugs used to control hypercholesterolemia by inhibiting the enzyme hydroxy-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase), involved in the synthesis of cholesterol by the mevalonate pathway. The cestodes present the mevalonate pathway, but without the branch that leads to cholesterol synthesis and, thus, they are dependent on the uptake of cholesterol from the host. It has been shown in different organisms that after inhibition of HMG-CoA reductase, there was a reduction in protein prenylation, growth arrest, sterility and lethality. In this way, the HMG-CoA reductase enzyme appears as a potential therapeutic target. With the aim of finding new alternatives for the treatment of diseases caused by cestodes, the present work uses a strategy of action based on drugs repositioning. The HMG-CoA reductase enzyme is highly conserved in different cestodes and the comparative modeling of the three-dimensional structure of the *M. corti* HMG-CoA reductase enzyme (McosHMG8) revealed a structural organization similar to other HMG-CoA reductases and conservation of the catalytic domain of the enzyme. Computational molecular docking analyses showed that simvastatin interacts with McosHMG8 through three hydrogen bonds, a smaller number of interactions than human HMG-CoA reductase, which interacts through eight hydrogen bonds. The effects of simvastatin on *M. corti* tetrathyridia at concentrations of 50 μ M, 100 μ M and 150 μ M for up to 120 h of treatment showed that the tetrathyridia begin to lose mobility from 72 h at concentrations of 100 μ M and 150 μ M. In 120 h of simvastatin treatment, the tetrathyridia showed signs of degradation, such as the formation of bubbles in parasite tegument. These results shown that, at the concentrations tested (50 μ M, 100 μ M and 150 μ M), simvastatin may be decreasing the parasite viability. Computational docking analyzes to improve the prediction of the interaction form of simvastatin with McosHMG8, and more specific assays to quantify the mobility and viability of the tetrathyridia during treatment with simvastatin are required.

Key words: *M. corti*, drug repositioning, simvastatin, docking, cestodes.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características gerais de cestódeos

Os organismos do filo Platyhelminthes são acelomados, com simetria bilateral e achatados dorsoventralmente (COLLINS, 2017). O filo inclui organismos de vida livre, ecto ou endoparasitas, que possuem na extremidade anterior órgãos sensitivos e/ou de fixação. O filo é composto de seis classes: Catenulida, Monogenea, Rhabditophora, Tubellaria, Trematoda e Cestoda, sendo as classes Cestoda e Trematoda compostas de organismo parasitas (NEVES et al., 2011).

A classe Cestoda é composta por organismos endoparasitas (cestódeos) que são desprovidos de epiderme, cavidade geral e sistema digestivo (KOZIOL, 2017). Seus órgãos de fixação estão localizados na parte anterior, o corpo em geral é alongado e constituído por segmentos. Cestódeos adultos geralmente apresentam características típicas, como por exemplo, o corpo alongado com três regiões distintas: (i) Uma anterior, constituída pelo escólex, no qual se encontram as estruturas de fixação; (ii) outra estreita, (região do pescoço), que sustenta o escólex e o liga ao restante do corpo do parasito; (iii) e por fim o estróbilo, região segmentada onde estão localizadas as proglótides (unidades reprodutivas) (KOZIOL, 2017). A classe Cestoda compreende duas subclasses: Cestodaria e Eucestoda, onde os vermes pertencentes à subclasse Cestodaria não são segmentados e possuem apenas um conjunto de órgãos reprodutivos; os pertencentes à sub-classe Eucestoda são segmentados em proglótides, cada uma delas contendo órgãos reprodutivos masculinos e femininos. A sub-classe Eucestoda possui várias ordens, entre elas a Tetracystida, Trypanorhynca, Pseudophyllidea e Cyclophyllidea (LITTLEWOOD; ROHDE; CLOUGH, 1999).

A ordem Cyclophyllidea é subdivida em diversas famílias, sendo uma delas a família Taeniidae, nos quais incluem parasitos de animais domésticos (COGHLAN et al., 2019). Esta família é considerada, do ponto de vista médico, veterinário e econômico, a mais importante da ordem Cyclophyllidea, incluindo, por exemplo, vermes dos gêneros *Taenia* e *Echinococcus* (NAKAO et al., 2010). Outra família que também é pertencente à ordem Cyclophyllidea é a família Mesocestoididae, esta família inclui vermes do gênero *Mesocestoides* que infectam uma ampla gama de organismos, incluindo o organismo-modelo *Mesocestoides corti* que é amplamente utilizado para o estudo de diversas características da biologia de cestódeos, como resposta a estresse, desenvolvimento e também utilizado para estudos farmacológicos (ALVAREZ et al., 2010).

1.2. Doenças causadas por cestódeos

Em seu ciclo de vida os cestódeos requerem pelo menos dois hospedeiros (hospedeiro intermediário e hospedeiro definitivo), podendo infectar seres humanos e animais domésticos/selvagens (ZAROWIECKI; BERRIMAN, 2015). Desta forma as doenças causadas por cestódeos (cestodíases) constituem um problema de saúde pública e animal (ITO; BUDKE, 2014). Os seres humanos podem servir como hospedeiro definitivo e hospedeiro intermediário para algumas espécies, como por exemplo, *Taenia solium* e *Hymenolepis nana*, sendo uma das formas de infecção a ingestão de alimentos ou água contaminados com os ovos desses parasitos.

As doenças mais relevantes causadas por cestódeos são a equinococose (causada por *Echinococcus* spp.) e cisticercose/teníase (causada por *Taenia solium*), constando na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (do inglês: World Health Organization - WHO) (http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/). A equinococose pode ocorrer de 3 formas: i) equinococose policística, ii) equinococose cística (ou hidatidose cística) e iii) equinococose alveolar, causadas pelas espécies *Echinococcus vogeli*, *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus multilocularis*, respectivamente. As duas últimas são as formas de maior importância devido a sua relevância médica e de saúde pública (MANDAL; MANDAL, 2012).

A infecção humana com *E. granulosus* (equinococose cística) leva ao desenvolvimento de um ou mais cistos que são localizados com maior frequência no fígado e nos pulmões (CRAIG et al., 2007). O período de incubação assintomático da doença pode durar anos, até que os cistos cresçam a ponto de desencadear sinais clínicos. Segundo a WHO, metade de todos os pacientes que são tratados para a infecção, recebe o tratamento anos depois da infecção inicial do parasito. Alguns sintomas comumente observados quando a equinococose ocorre no fígado são dores de cabeça, náuseas e vômitos. Se o pulmão é afetado, os sinais clínicos incluem tosse crônica, dor torácica e falta de ar. Outros sinais que possam ocorrer vão depender da localização do cisto e pressão exercida sobre os tecidos circundantes (HIGUITA; BRUNETTI; MCCLOSKEY, 2016). O diagnóstico da doença é difícil devido à lentidão de crescimento dos cistos, porém o diagnóstico pode ser feito através de raio-x, tomografia computadorizada ou ecografias e sua confirmação laboratorial depende de testes sorológicos (BIAVA; DAO; FORTIER, 2001). Existem três formas de tratamento para a equinococose cística: i) tratamento percutâneo dos cistos pela técnica de PAIR (punção, aspiração, injeção, re-aspiração); ii) cirurgia; e iii) tratamento antiparasitário (BRUNETTI; KERN; VUITTON, 2010).

A prevenção à doença pode ser feita através de desparasitação periódica nos animais (principalmente cães), melhoria de higiene no abate de gado e campanhas de educação pública. A equinococose cística é encontrada no mundo todo (Figura 1), mas há países em que a doença é endêmica ou hiperendêmica (CADAVID RESTREPO et al., 2016).

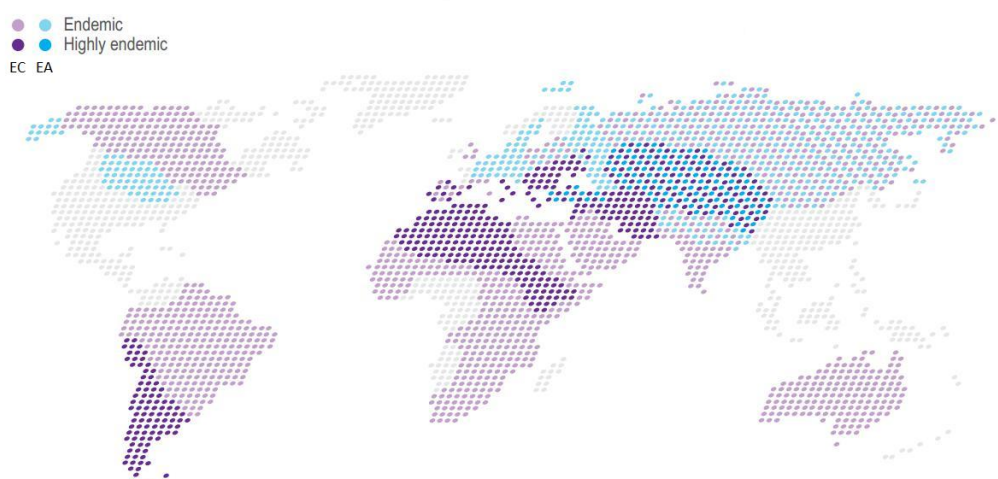


Figura 1: Distribuição da equinococose cística (EC) e equinococose alveolar (EA). As cores indicam as zoonoses, EC em roxo, EA em azul. As intensidades das cores indicam prevalência. Adaptado de WHO (<http://www.who.int/echinococcosis/en/>).

Segundo a WHO as taxas de incidência humana para equinococose cística em regiões endêmicas tem prevalência de 5% a 10%. No gado a prevalência da equinococose cística encontrada em matadouros nas regiões hiperendêmicas da América do Sul varia de 20% a 95% dos animais abatidos (CARDONA; CARMENA, 2013).

Tratamentos efetivos contra as cestodíases ainda não estão disponíveis. A principal forma de tratamento é o uso de derivados de benzimidazóis, como, triclabendazol, albendazol e mebendazol (SANGSTER; COWLING; WOODGATE, 2018). Estes fármacos, contudo, apresentam várias limitações quanto à efetividade do tratamento e restrições de aplicação associadas a efeitos colaterais, podendo favorecer o desenvolvimento de resistência. Assim, existe a necessidade de identificar novas formas terapêuticas mais eficientes para o tratamento das cestodíases.

1.3. Reposicionamento de fármacos e *docking* molecular

A estratégia de reposicionamento de fármacos tornou-se popular nos últimos anos, sendo que isto é principalmente devido ao fato de que o processo de pesquisa e o desenvolvimento de um novo fármaco é complicado, exaustivo, caro e pode levar de 10 a 17 anos, desde a ideia até o medicamento comercializado. Por outro lado, o reposicionamento de fármacos oferece a possibilidade de reduzir o tempo, sendo um processo de 3 a 12 anos, e significativa diminuição nos custos (ASHBURN; THOR, 2004). O termo reposicionamento de fármaco ou reaproveitamento de fármaco é geralmente aplicado para a descoberta de novos usos terapêuticos para fármacos que já são comercializados e usados clinicamente (MUTHYALA, 2012).

O reposicionamento de fármacos busca metodologias de ancoragem mais rápidas, eficazes e confiáveis. A Triagem virtual é um método rápido e econômico para avaliar uma variedade de compostos, e por isto, surge como uma importante ferramenta. Este método abrange as estratégias de um rastreamento virtual baseado na estrutura do ligante (MA; CHAN; LEUNG, 2013). A triagem virtual baseada na estrutura do receptor (proteína alvo) emprega métodos de *docking* molecular na análise de grandes bases de dados de compostos com o objetivo de elencar os compostos com o melhor modo de ligação predito e assim permitir a seleção de compostos para testes *in vitro* (FERREIRA et al., 2015).

O *docking* molecular tem um papel importante na estratégia de reposicionamento de fármacos, pois é por complementaridade química que ocorre o reconhecimento molecular de um ligante no sítio receptor alvo. Este processo envolve fatores entálpicos (energia máxima interna de um sistema) e entrópicos (energia termodinâmica referente às reações químicas), considerando a flexibilidade do ligante e da proteína. Através do uso do *docking* molecular é possível verificar qual fármaco é capaz de se ajustar ao sítio ativo de um receptor, tanto geometricamente quanto quimicamente (WU; ARIGHI; ROSS, 2017).

1.4. Estatinas e a enzima HMG-CoA redutase

As estatinas (Figura 2) são um conjunto de fármacos usados para controlar os níveis elevados de colesterol no sangue (hipercolesterolemia), já que possuem a capacidade de inibir a produção de colesterol, e também são utilizadas para prevenir doenças cardiovasculares. Outros possíveis usos terapêuticos para as estatinas incluem tratamentos de doenças inflamatórias, imunológicas, e como medicamentos anticancerígenos (DEMIERRE et al., 2005).

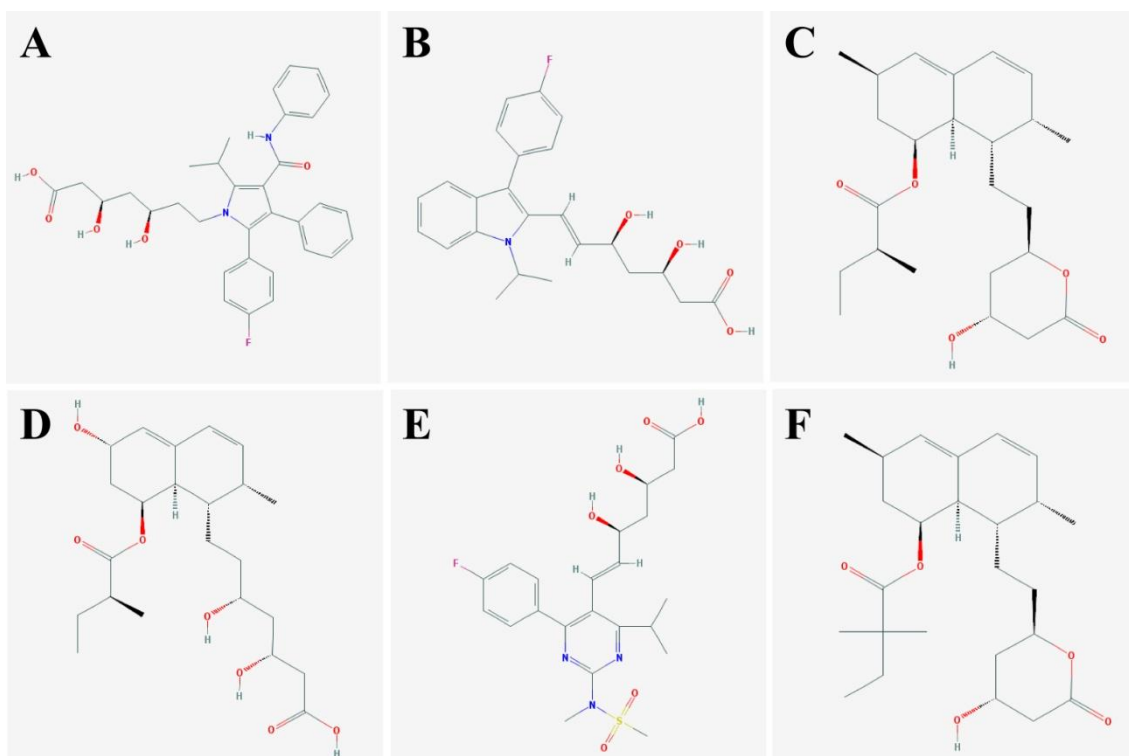


Figura 2: Representação da estrutura química das estatinas. A, Atorvastatina. B, Fluvastatina. C, Lovastatina. D, Pravastatina. E, Rosuvastatina. F, Simvastatina.

As estatinas têm como seu alvo a enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, a enzima responsável pela conversão de HMG-CoA em mevalonato. A via do mevalonato (Figura 3) é essencial nos eucariotos pela sua importância em processos como a síntese de colesterol, heme, ubiquinona e para a prenilação e glicosilação proteica (RAUTHAN; PILON, 2011).

A síntese de colesterol não ocorre em cestódeos, mas componentes desta via que também atuam em vias de produção de outros componentes essenciais foram identificados em seus genomas (COGHLAN et al., 2019), como por exemplo, enzimas necessárias para a síntese de mevalonato (TSAI et al., 2013). O uso das estatinas como drogas antiparasitárias já foi testada nos protozoários *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum* e *Leishmania major* (COPPENS; COURTOY, 1996). Estudos recentes, no platelminto *Schistosoma mansoni*, mostraram um potencial anti-helmíntico das estatinas em cultivos *in vitro* de diferentes estágios do *S. mansoni*, como esquistossômulos e adultos, que infectam o hospedeiro mamífero (ROJO-ARREOLA et al., 2014). No entanto, em cestódeos o efeito das estatinas na sobrevivência do parasito ainda não foi avaliado. Portanto, o uso de estatinas é uma forma não só de estudar o mecanismo de transporte de colesterol e metabolismo como também a prospecção de novas drogas anti-helmínticas, o que contribui para o aumento do conhecimento da biologia básica destes organismos.

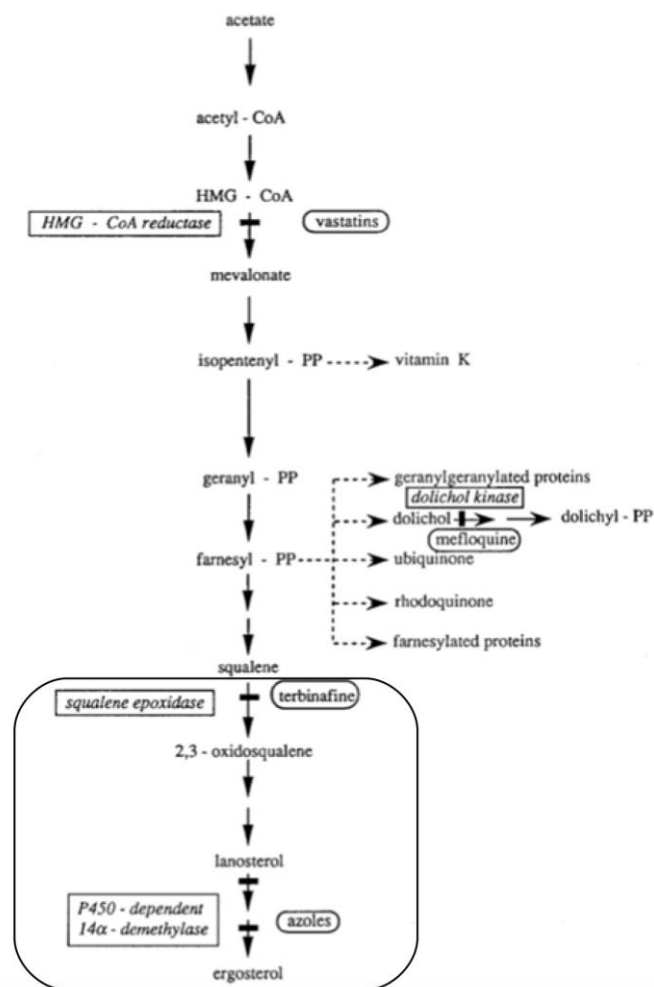


Figura 3: Via do mevalonato. Representação esquemática da via do mevalonato em protozoários e helmintos. As enzimas (em quadrado) que são suscetíveis à ação de drogas (em oval) estão indicadas. Em retângulo, esta representada o ramo da via que leva a síntese de ergosterol, ausente em cestódeos. Fonte: COPPENS; COURTOY, 1996.

1.5. *M. corti* como organismo-modelo

Estudos envolvendo cestódeos de relevância médica e veterinária, como os da família Taenidae (por exemplo: gêneros *Echinococcus* e *Taenia*), são dificultados pela ausência de protocolos bem estabelecidos para a manutenção destes organismos em condições laboratoriais, sendo necessária a coleta do material a campo ou em matadouros (LUSTIGMAN et al., 2012). Neste contexto, a disponibilidade de um organismo modelo como *M. corti* permite o estudo de aspectos básicos sobre a biologia de cestódeos, pois pode ser facilmente mantido *in vivo* e *in vitro*.

M. corti, assim como *E. granulosus*, é um endoparasito também pertencente à classe Cestoda. O seu ciclo de vida (Figura 4) tem um hospedeiro definitivo (carnívoros) e dois hospedeiros intermediários (MEHLHORN; ASPÖCK, 2008). O primeiro hospedeiro intermediário é um artrópode e o segundo hospedeiro intermediário pode ser mamíferos, aves, anfíbios ou

répteis. No seu ciclo de vida apresenta três estágios: i) oncosfera, que é ingerida pelo primeiro hospedeiro intermediário. Após a eclosão, o embrião hexacanto penetra na cavidade corpórea deste primeiro hospedeiro intermediário, onde se desenvolve no primeiro estágio larval; ii) cisticercóide (primeiro estágio larval), quando ingerido por um segundo hospedeiro intermediário, se transforma no segundo estágio larval; iii) tetratrídeo (segundo estágio larval), se replica por reprodução assexuada no segundo hospedeiro intermediário. Quando ingerido pelo hospedeiro definitivo sofre o processo de estrobilização para formar o iv) verme adulto, sexualmente diferenciado e segmentado (proglótides), o que é uma característica típica dos cestódeos.

Os tetratrídeos podem ser facilmente mantidos *in vivo* por uma série de passagens em hospedeiros experimentais como camundongos e ratos, onde se reproduzem assexuadamente e o seu processo de maturação na forma adulta pode ser induzido e seguido *in vitro* (MARKOSKI et al., 2003). Utilizando *M. corti* como modelo, nosso grupo tem buscado compreender aspectos relacionados à biologia de cestódeos, principalmente aqueles relacionados com a expressão gênica diferencial durante o desenvolvimento (BASIKA et al., 2019). Além disso, esse modelo experimental está sendo utilizado para testar o uso de fármacos que apresentem potencial para inibir o desenvolvimento do parasito. Uma classe de fármacos, as estatinas, que atuam como inibidores da enzima HMG-CoA redutase, está tendo seus efeitos sobre a viabilidade dos tetratrídeos avaliados, a partir dos efeitos fenotípicos após o tratamento com a droga.

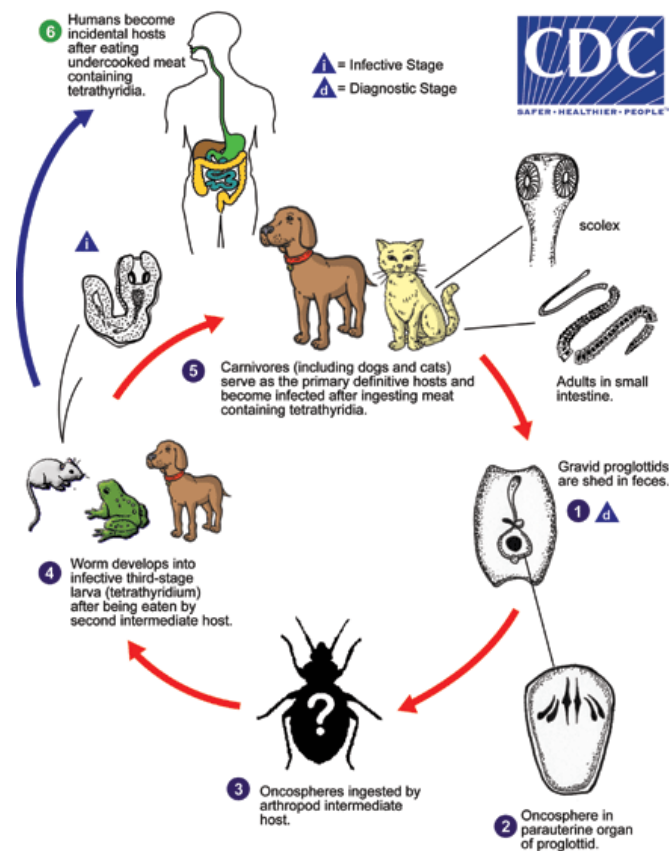


Figura 4: Representação esquemática do ciclo de vida de *M. corti*. As diferentes fases do desenvolvimento do parasito estão representadas de 1 a 5, e em 6 está representado a infecção acidental em humanos.

2. JUSTIFICATIVA

Cestódeos são helmintos parasitas de distribuição global. Endoparasitas obrigatórios, são capazes de infectar uma extraordinária diversidade de animais e são facilmente transmitidos entre hospedeiros. Doenças causadas por cestódeos (cestodíases) afetam tanto o homem como animais domésticos, e as consequências sociais e econômicas são acentuadas. As doenças mais relevantes causadas por cestódeos são a equinococose/hidatidose (causada por *Echinococcus* spp.) e cisticercose (causada por *Taenina solium*), constando na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da WHO.

A principal forma de tratamento dessas doenças é pelo uso de derivados de benzimidazóis, como, por exemplo, triclabendazol, albendazol e mebendazol. Estes fármacos, contudo, apresentam várias limitações quanto à efetividade do tratamento e restrições de aplicação associadas a efeitos colaterais podendo favorecer o desenvolvimento de resistência. Assim, existe a necessidade de identificar novas formas terapêuticas mais eficientes para o tratamento das cestodíases.

Portanto, no intuito de buscar novas alternativas para o tratamento de doenças causadas por cestódeos, como a equinococose cística, estudos buscam o reposicionamento de fármacos como estratégias de ação para um possível novo tratamento. Neste contexto, as estatinas surgem como alternativa por serem fármacos usados para controlar os níveis de colesterol no sangue (hipercolesterolemia), já que estes fármacos têm como alvo a HMG-CoA redutase, enzima responsável pela conversão de HMG-CoA em mevalonato. Cestódeos não sintetizam colesterol *de novo*, sendo esta molécula captada do hospedeiro, mas apresentam a via do mevalonato que é importante para produzir vários compostos importantes para esses organismos. A enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase é uma das mais importantes da via do mevalonato e representa um potencial alvo terapêutico para as estatinas nesses parasitas. A via do mevalonato é considerada vital nos cestódeos, como o organismo modelo *M. corti*, já que componentes desta via atuam em vias de produção de componentes essenciais.

O uso de fármacos aprovados e disponíveis, cujos alvos são parte das vias de transporte e metabolismo associado ao colesterol, visando interferir na viabilidade de *M. corti*, é uma estratégia interessante, pois reduz custos de descoberta e testes de novas moléculas. Além disso, contribuirá para o melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos básicos do parasito.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Analisar, *in silico*, as formas de interação da enzima HMG-CoA redutase de *M. corti* com a sinvastatina e avaliar o efeito desse fármaco na viabilidade de tetratirídeos de *M. corti* em cultivo *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Determinar a estrutura tridimensional da enzima HMG-CoA redutase de *M. corti*.

3.2.2. Analisar as formas de interação proteína-ligante da estrutura da HMG-CoA redutase de *M. corti* com a sinvastatina.

3.2.3. Avaliar *in vitro* os efeitos da sinvastatina sobre tetratirídeos de *M. corti*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Análise *in silico* de conservação da sequência de aminoácidos da enzima HMG-CoA redutase

A partir da sequência deduzida de aminoácidos da enzima HMG-CoA redutase de *M. corti* (MCOS_0000573601) recuperada do banco de dados WormBase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>), foi realizado um Blastp contra as sequências de outros cestódeos no próprio servidor do WormBase ParaSite, no intuito de recuperar as sequências deduzidas de aminoácidos da enzima HMG-CoA redutase destes organismos. Após recuperar estas sequências, realizamos o alinhamento múltiplo no software MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) para analisar o grau de conservação das sequências desta enzima.

Ao realizarmos buscas na literatura, encontramos a estrutura do cristal da enzima HMG-CoA redutase humana complexada com a sinvastatina (1hw9) depositada no banco de dados Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>). Para avaliar a conservação desta enzima humana com seu ortólogo de *M. corti*, recuperamos a sequência de aminoácidos da HMG-CoA redutase humana (P04035) no banco de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>) e realizamos o alinhamento múltiplo no software MultiAlin.

4.2. Modelagem comparativa e *docking* molecular da enzima HMG-CoA redutase de *M. corti*

A predição da estrutura tridimensional da enzima HMG-CoA redutase de *M. corti* foi realizado por modelagem comparativa utilizando a ferramenta SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). A sequência de aminoácidos da enzima HMG-CoA redutase, recuperada do banco de dados WormBase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>), foi submetida no servidor, que realizou uma busca por estruturas para servirem como moldes.

Para a modelagem comparativa, cinco estruturas foram selecionadas como molde (3cd0, 1dq9, 2r4f, 1hwk e 1hw8) de acordo com os parâmetros de GMQE (Estimativa global de qualidade de modelo, do inglês *Global Model Quality Estimation*), cobertura e a resolução do molde (< 3 Å). Oito modelos foram gerados, e a qualidade destes modelos foram avaliadas nas seguintes ferramentas: SWISS-MODEL Structure Assessment (<https://swissmodel.expasy.org/assess>), no PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>) e no ModFOLD (<http://www.reading.ac.uk/bioinf/ModFOLD/>).

Todos os experimentos de *docking* molecular foram realizadas no portal DockThor (<http://dockthor.lncc.br/>). Nestes experimentos de *docking* molecular, utilizamos o modelo 08 da HMG-CoA redutase de *M. corti* (McosHMG8) gerado no SWISS-MODEL, o ligante sinvastatina e o cofator adenosina-5-difosfato (ADP). A calibração dos parâmetros foi realizada por meio de um *redocking* na estrutura da HMG-CoA redutase humana complexada com a sinvastatina (1hw9) e por buscas na literatura.

4.3. Manipulação *in vivo* e *in vitro* de *M. corti*

Os tetratirídeos foram mantidos *in vivo* por meio de passagens seriadas em hospedeiros experimentais conforme descrito por Markoski et al. (2003). Resumidamente, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*, BALB/c) fêmeas, da linhagem BALB/c com 90 dias de idade. Os camundongos receberam, por injeção intraperitoneal, uma suspensão de aproximadamente 600 tetratirídeos em 0,2 ml de tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) pH 7,4. Após três meses de infecção, os camundongos foram eutanasiados pela inalação de uma concentração letal do anestésico isoflurano e após a confirmação do óbito, foram mantidos submersos em etanol 70% por 5 min para remoção das sujidades. Após este período, os tetratirídeos foram recuperados por procedimentos cirúrgicos *post-mortem* por meio da aspiração da cavidade peritoneal. Após 3 passagens de infecção em camundongos, foi efetuada uma passagem em ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar), necessária para a manutenção da capacidade infectiva dos tetratirídeos. Foram utilizados ratos fêmeas, da linhagem Wistar com 90 dias de idade. Os ratos receberam, por injeção intraperitoneal, uma suspensão de aproximadamente 1.000 tetratirídeos em 0,5 ml de PBS. O processo de eutanásia, dissecação e recuperação dos tetratirídeos foram os mesmos descritos para camundongos. Todos os procedimentos experimentais envolvendo camundongos/ratos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS e realizados de acordo com as normas estabelecidas no projeto nº 32793.

4.4. Avaliação *in vitro* dos efeitos da sinvastatina em tetratirídeos de *M. corti*

O ensaio *in vitro* para avaliar os efeitos da sinvastatina em tetratirídeos de *M. corti* foi realizado em placas de 96 poços (15-20 tetratirídeos/poço), onde foram testadas três concentrações de sinvastatina (50 µM, 100 µM e 150 µM) em tetratirídeos de *M. corti* por até 120 h. Neste ensaio, foram utilizados três controles para cada concentração: meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB); meio RPMI suplementado com 10% de SFB e o diluente do fármaco (DMSO); e o anti-helmíntico albendazol (200 ng/mL). O meio foi trocado diariamente. Os parasitos foram avaliados em 24, 48, 72, 96 e 120 h de tratamento. Os parasitos foram acompanhados diariamente em microscópio de luz. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

4.5. Coloração de tetratirídeos com eosina

A coloração dos tetratirídeos após o tratamento com a sinvastatina foi realizada pela coloração com a eosina. Ao final de cada tratamento com o fármaco sinvastatina (24, 48, 72, 96 e 120 h), os tetratirídeos foram lavados com 150 µl de PBS, após a lavagem foram incubados por 30 min com 150 µl da solução eosina 0,05%, e após o período de incubação foram lavados com 150 µl de PBS para retirar o excesso de eosina. Os parasitos foram mantidos em 150 µl de PBS para serem observados no microscópio.

5. RESULTADOS

5.1. Conservação da enzima HMG-CoA redutase

Com o objetivo de analisar o grau de conservação da enzima HMG-CoA redutase nos cestódeos, realizamos um Blastp na plataforma do WormBase ParaSite, utilizando a sequência da enzima de *M. corti*, para recuperar as seqüências de ortólogos da HMG-CoA redutase de outras espécies de cestódeos. Após a recuperação destas seqüências, realizamos o alinhamento múltiplo que mostrou que a enzima HMG-CoA redutase de *M. corti* é altamente conservada em diferentes cestódeos como *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *Echinococcus canadensis*, *Taenia asiática*, *Taenia saginata*, *T. solium* e *Taenia multiceps* (Figura 5).

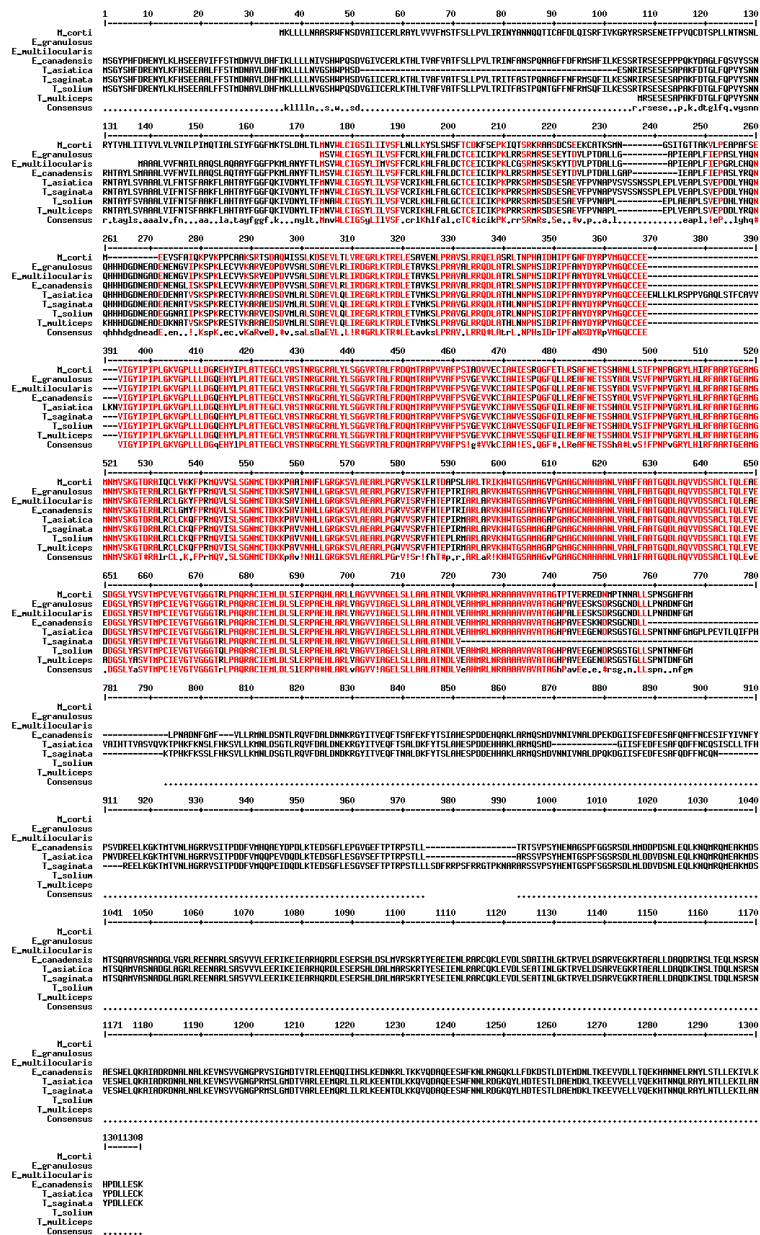


Figura 5: Alinhamento Múltiplo. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da HMG-CoA redutase de *M. corti*, *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. canadensis*, *T. asiática*, *T. saginata*, *T. solium* e *T. multiceps*. Em vermelho, estão representados os resíduos de aminoácidos conservados e em preto os resíduos com variação nas diferentes seqüências.

O alinhamento múltiplo também foi realizado com a sequência de aminoácidos da enzima HMG-CoA redutase humana e a sequência de aminoácidos da enzima de *M. corti* (MCOS_0000573601) no software MultAlin, para avaliarmos o nível de conservação da enzima humana com a enzima de *M. corti*. O alinhamento múltiplo mostrou 49 % dos resíduos de aminoácidos conservados da HMG-CoA redutase de *M. corti* em relação à enzima humana, principalmente na porção catalítica da enzima (resíduos 460-888) (Figura 6).

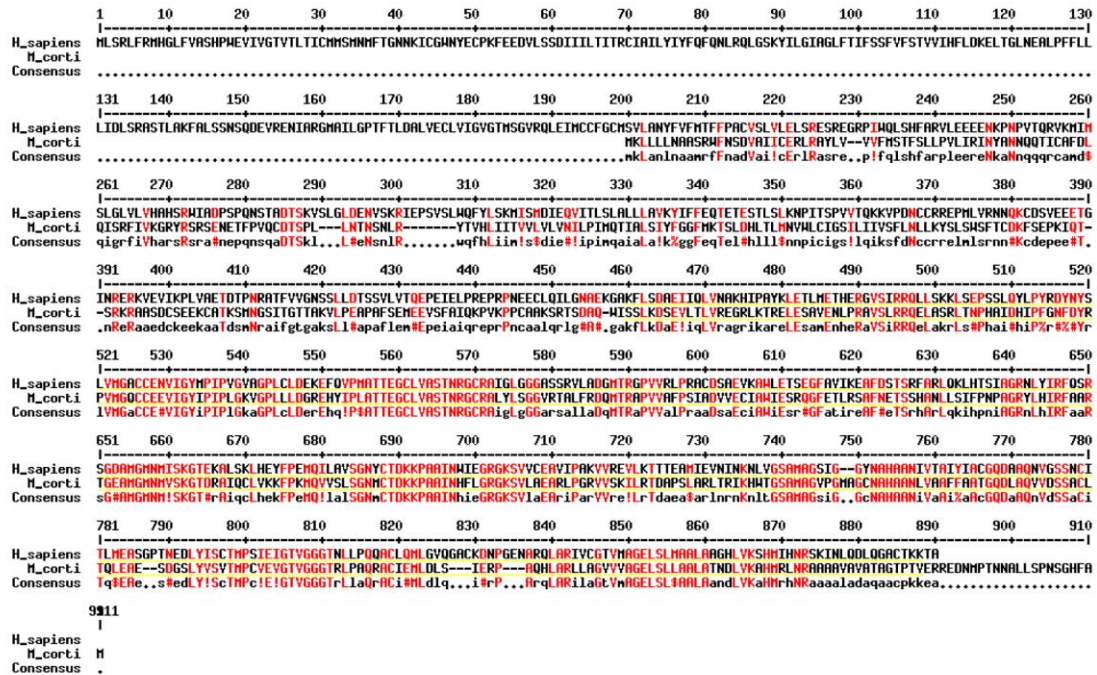


Figura 6: Alinhamento de sequências. Alinhamento das sequências de aminoácidos da HMG-CoA redutase de *H. sapiens* e *M. corti*. Em vermelho estão representados os resíduos de aminoácidos conservados e em preto os resíduos com variação nas duas sequências. Os resíduos de aminoácidos da porção catalítica da enzima (resíduos 460-888) estão sublinhados em amarelo.

5.2. Estrutura tridimensional da enzima HMG-CoA redutase de *M. corti*

Para determinar e conhecer a organização estrutural da enzima HMG-CoA redutase de *M. corti* (McosHMG) a predição da estrutura tridimensional foi realizada por modelagem comparativa no SWISS-MODEL. Esta modelagem comparativa resultou em oito estruturas tridimensionais de um dos monômeros da enzima (Tabela 1). Estes modelos (McosHMG 1-8) tiveram suas qualidades avaliadas no servidor do SWISS-MODEL, PDBsum e MODFold. Considerando a relativa conservação de resíduos entre estas proteínas, como esperado a estrutura geral dos modelos de McosHMG é muito semelhante àquela observada na estrutura da HMG-CoA redutase humana (Figura 7).

Tabela 1: Avaliação das estruturas tridimensionais dos monômeros gerados na ferramenta SWISS-MODEL.

Organismo	Código PDB	Modelo	SWISS-MODEL GMQE	MODFold Escore global
<i>Homo sapiens</i>	3cd0	McosHMG1	0,49	0,3968
<i>Homo sapiens</i>	1dq9	McosHMG2	0,48	0,3899
<i>Homo sapiens</i>	2r4f	McosHMG3	0,18	0,3959
<i>Homo sapiens</i>	3cd0	McosHMG4	0,47	0,3883
<i>Homo sapiens</i>	1hwk	McosHMG5	0,47	0,3918
<i>Homo sapiens</i>	1hw8	McosHMG6	0,47	0,3977
<i>Homo sapiens</i>	2r4f	McosHMG7	0,46	0,3840
<i>Homo sapiens</i>	1hwk	McosHMG8	0,46	0,3818

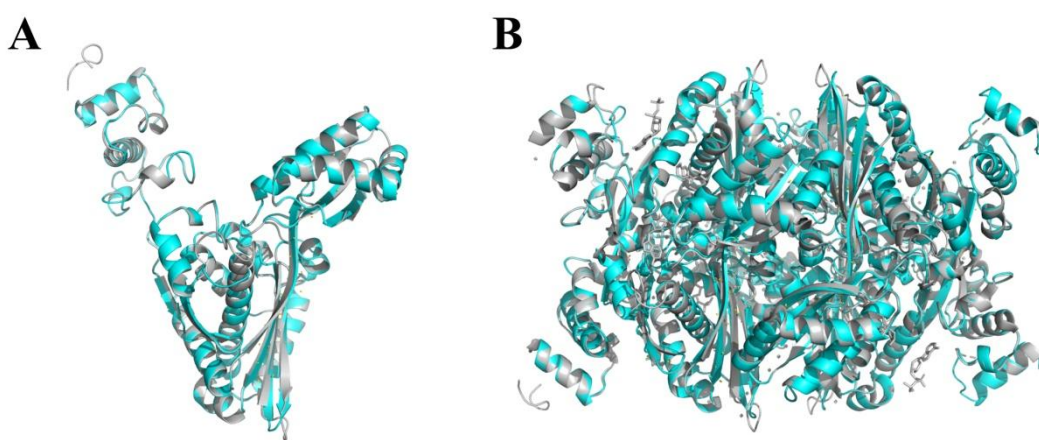


Figura 7: Sobreposição das estruturas tridimensionais da enzima HMG-CoA redutase humana (1hw9) e do modelo McosHMG 8. A, sobreposição dos monômeros (cadeia A), em cinza o monômero da HMG-CoA redutase humana e em ciano o monômero da HMG-CoA redutase de *M. corti*. B, sobreposição dos tetrâmeros, em cinza o tetrâmero da HMG-CoA redutase humana e em ciano o tetrâmero da HMG-CoA redutase de *M.corti*.

Dentre os oitos modelos gerados, o modelo McosHMG8 (Figura 8) obteve o melhor escore de avaliação nestas ferramentas. O monômero revela uma estrutura única composta de três domínios: um domínio pequeno, helicoidal N-terminal, domínio N (resíduos 248-313), um grande domínio L (resíduos 314-376 e 480-641) e um pequeno domínio S (resíduos 377-467) que esta inserida dentro do domínio L. Os domínios S e L são conectados por um *loop* (resíduos 468-480) que é estabilizado por interações com resíduos dos monômeros vizinhos. Este *loop* ou cis-loop, contém um cis-peptídeo entre os resíduos C474 e T475 que é essencial na formação do sítio de ligação da HMG-CoA redutase.

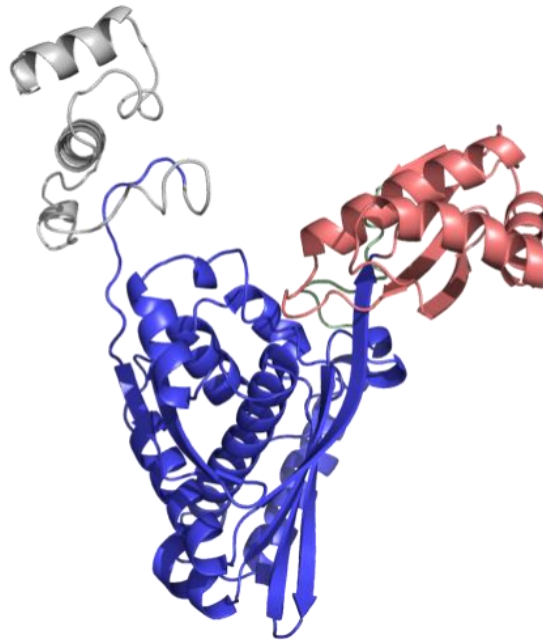


Figura 8: Estrutura tridimensional (monômero) do modelo McoSHMG 8. Representação dos domínios no monômero (cadeia A) em cores. Cinza, N-domínio. Azul, L-domínio. Rosa, S-domínio.

Este monômero obteve uma pontuação de 0,46 no GMQE, além disso, 91,8 % dos resíduos estavam nas regiões mais favorecidas e 99,7 % dos resíduos nas regiões permitidas no gráfico de Ramachandran (Figura 9) e uma pontuação de 0,3818 na escala global pelo MODFold.

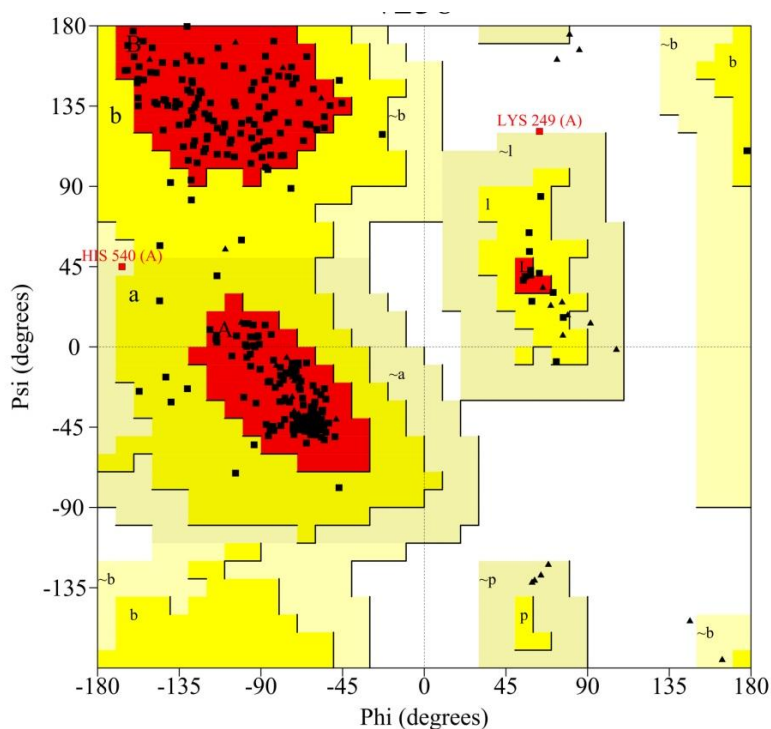


Figura 9: Gráfico de Ramachandran do monômero McoSHMG8. As regiões mais favorecidas estão representadas em vermelho, em amarelo as regiões adicionais permitidas e em creme as regiões generosamente permitidas.

Baseado em estudos anteriores (ISTVAN; DEISENHOFER, 2000), o modelo também foi gerado como um tetrâmero (a partir do McosHMG8), e este modelo foi selecionado para a análise de *docking*. Este modelo também teve sua qualidade avaliada. A pontuação obtida na avaliação deste tetrâmero foi de 0,46 no GMQE, e 91,5 % de resíduos em regiões mais favorecidas e 98,6 % dos resíduos nas regiões permitidas no gráfico de Ramachandran.

O tetrâmero de McosHMG8 (Figura 10) é composto por quatro cadeias (monômeros) iguais entre si, cada um com um sítio ativo (A, B, C e D), que está localizado no domínio L, e com sítio catalítico localizado na interface de dois monômeros.

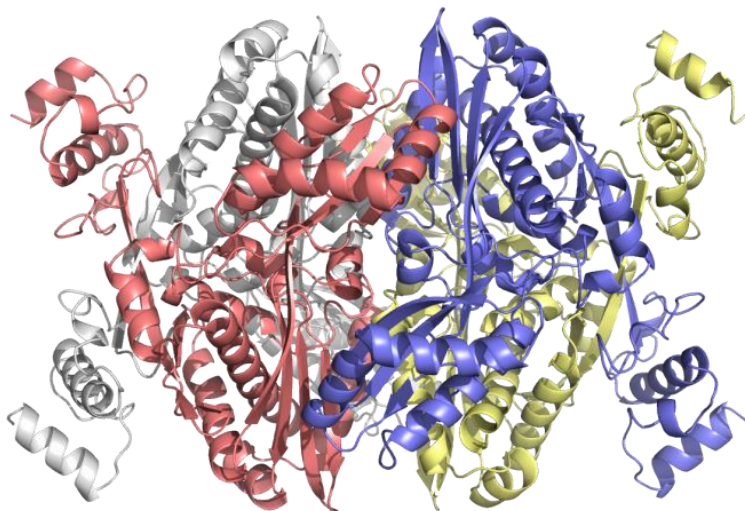


Figura 10: Estrutura tridimensional (tetrâmero) do modelo McosHMG8. Representação dos monômeros (cadeias) em cores. Cinza, cadeia A. Rosa, cadeia B. Azul, cadeia C. Amarelo, cadeia D.

Os experimentos de *docking* molecular foram realizados no portal do DockThor, utilizando a estrutura tridimensional do tetrâmero de McosHMG8, o ligante sinvastatina (Figura 11) e o cofator ADP. Estes experimentos de *docking* molecular foram realizados para analisarmos as interações do fármaco sinvastatina com o tetrâmero de McosHMG8.

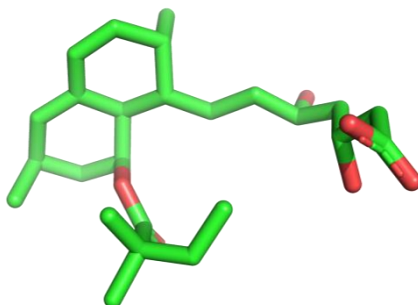


Figura 11: Sinvastatina. Ligante utilizado nos experimentos de *docking* molecular com a estrutura tridimensional do tetrâmero McosHMG8.

Os parâmetros do *docking* foram calibrados por meio de um *redocking* da estrutura da HMG-CoA redutase complexada com a sinvastatina (1hw9). Neste processo de calibração chegamos ao menor valor de RMSD de 0,986, onde as coordenadas da caixa são: coordenadas do centro da caixa x=8, y= -9 e z= -9 e tamanho da caixa x=9, y=9 e z=9 (Figura 12).

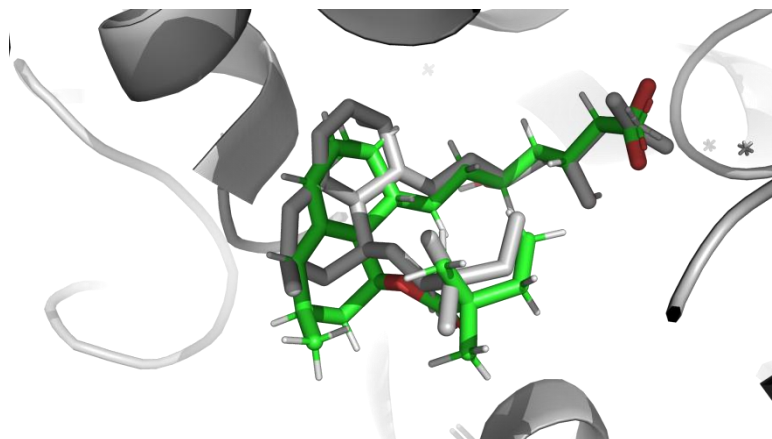


Figura 12: Resultado do *redocking* na estrutura da HMG-CoA redutase complexada com a sinvastatina (1hw9). Sobreposição dos ligantes (sinvastatina), o ligante de referência está representado na cor cinza e em verde está representado o ligante com melhor modo de ligação.

Utilizando estes parâmetros como ponto de partida para o *docking* molecular na estrutura tridimensional do tetrâmero de McosHMG8, chegamos ao menor valor de RMSD de 1,5, e as coordenadas da caixa foram: coordenadas do centro da caixa x=7, y=-9 e z=-9 e tamanho da caixa x=10, y=10 e z=10 (Figura 13). Ligações de hidrogênio e contatos importantes são apresentados na Figura 14.

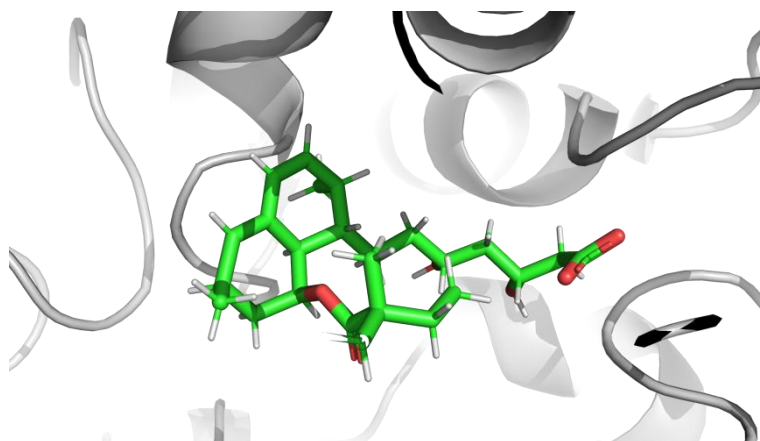


Figura 13: Resultado do *docking* molecular no modelo McosHMG 8. Ligante (sinvastatina) com o melhor modo de ligação representado em verde.

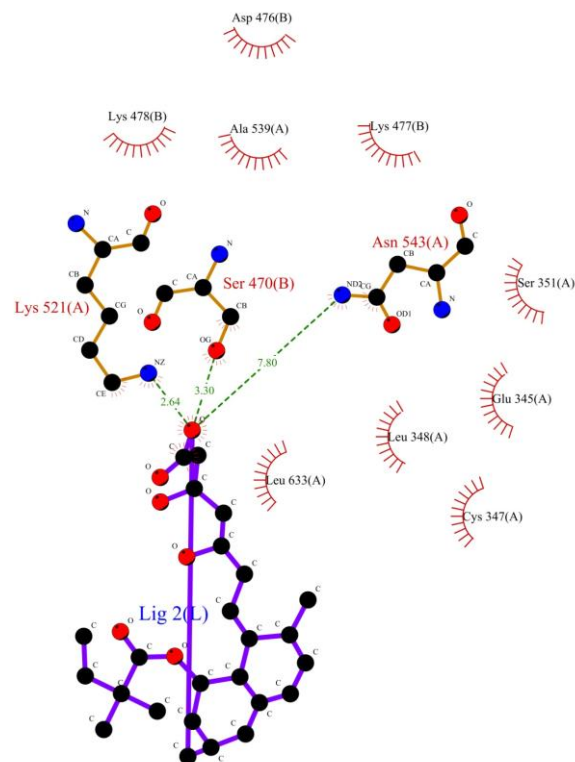


Figura 14: Interações da simvastatina com o modelo McoSHMG8. Representação das ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas em verde) da simvastatina com os resíduos Lys521 e Asn543 da cadeia A e Ser470 da cadeia B.

5.3. Avaliação *in vitro* dos efeitos da simvastatina em tetratirídeos de *M. corti*

Um ensaio *in vitro* foi realizado para avaliar os efeitos causados pelo fármaco simvastatina em tetratirídeos de *M. corti*. Neste experimento, os tetratirídeos foram tratados com as concentrações de 50 μM , 100 μM e 150 μM de simvastatina por até 120 horas, sendo que para cada concentração foram utilizados três controles, sendo dois negativos (Meio RPMI e DMSO) e um controle positivo (albendazol).

Durante o experimento, foi observado que o fármaco simvastatina causa uma diminuição na mobilidade dos tetratirídeos. A partir de 72 h de tratamento, há uma diminuição na mobilidade, que foi mais evidente em tetratirídeos tratados com as concentrações de 100 μM e 150 μM de simvastatina e com 120 h de tratamento não se tem mobilidade nos tetratirídeos tratados com estas concentrações em relação aos controles negativos. Já no controle positivo, após 72h de tratamento com o albendazol, os tetratirídeos apresentaram perda de mobilidade (paralisia) e perfurações no tegumento.

A partir de 96 h de tratamento, os tetratirídeos tratados com as concentrações de 100 μM e 150 μM de simvastatina estavam mais translúcidos e com 120 h de tratamento, além de estarem mais translúcidos houve também sinais de degradação (formação de bolhas no tegumento) (Figura 15) em comparação aos controles negativos, enquanto que no controle positivo, com 120 h de tratamento, os tetratirídeos tratados com o albendazol estavam totalmente paralisados e sem tegumento.

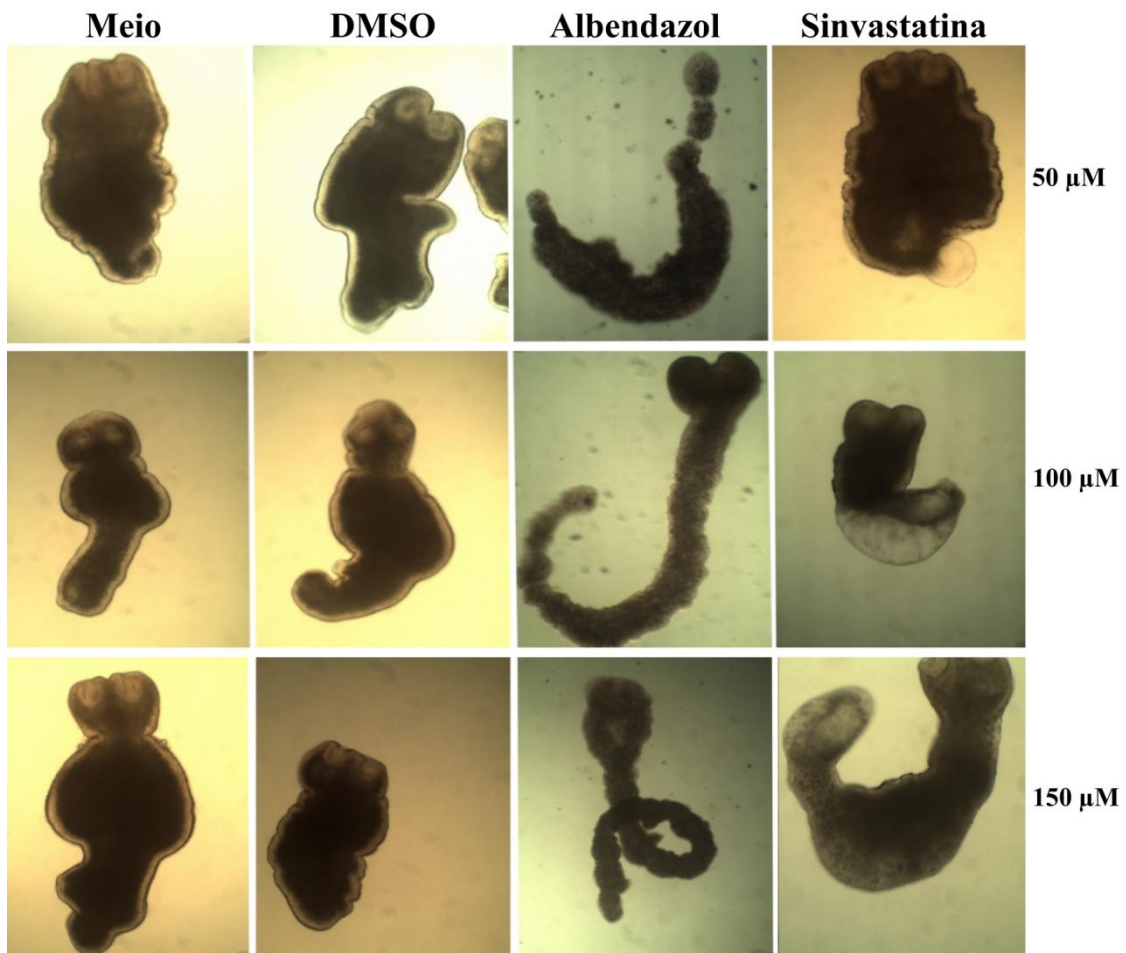


Figura 15: Efeitos da sinvastatina em tetratrídeos de *M. corti* em cultura. Tetratrídeos (aumento 20x) tratados com as concentrações de 50 µM, 100 µM e 150 µM de sinvastatina no último dia de tratamento (120 h) aparecem com a formação de bolhas no tegumento em comparação aos controles negativos (Meio e DMSO).

5.4. Coloração de tetratrídeos

A coloração dos tetratrídeos de *M. corti* com a eosina foi realizada ao final de diferentes tempos de tratamento com a sinvastatina (24, 48, 72, 96 e 120 h). Esta coloração foi realizada para que pudéssemos identificar tetratrídeos que foram mortos pelo tratamento com a sinvastatina. Durante o experimento, ao realizar estas marcações no final do tratamento (24, 48, 72, 96 e 120 h), observamos no microscópio de luz que nenhum dos tetratrídeos tratados ficou marcado pela eosina, ou seja, o fármaco nestas concentrações não causa a morte dos parasitos.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho o reposicionamento de fármacos foi utilizado como estratégia de ação na busca de um tratamento alternativo para doenças causadas por cestódeos, como por exemplo, a equinococose cística, causada pelo endoparasito *E. granulosus*. Nossos resultados mostraram que a sequência da enzima HMG-CoA redutase é altamente conservada nos cestódeos, o modelo tridimensional McosHMG8 tem uma organização estrutural similar ao da

enzima HMG-CoA redutase humana e o fármaco sinvastatina interage (predição *in silico*) com o modelo por meio de três ligações de hidrogênio. Os resultados de ensaios *in vitro*, para avaliar os efeitos da sinvastatina em tetratirídeos de *M. corti*, mostraram que o fármaco causa a perda de mobilidade e induz a degradação do parênquima do parasito.

Atualmente, a principal forma de tratamento da equinococose cística é pelo uso de drogas antiparasitárias, como o albendazol e o praziquantel, que apresentam várias limitações quanto à efetividade do tratamento e podem favorecer o desenvolvimento de resistência (SANGSTER; COWLING; WOODGATE, 2018). Os cestódeos não sintetizam colesterol *de novo*, sendo esta molécula captada do hospedeiro, mas eles apresentam a via do mevalonato (sem o ramo que leva à síntese de colesterol) (ZHENG et al., 2013). A enzima HMG-CoA redutase, cuja função é conversão da HMG-CoA em mevalonato, é uma das mais importantes dessa via e já foi demonstrado em diferentes organismos que após inibição da HMG-CoA redutase, existe uma redução na prenitação de proteínas, parada do crescimento, esterilidade e letalidade. Desta forma, a enzima surge como potencial alvo terapêutico.

A pesquisa e o desenvolvimento de um novo fármaco é um processo complicado, demorado, exaustivo e caro. Por isto, o reposicionamento de fármacos tornou-se uma estratégia importante nos últimos anos. Diferente das estratégias tradicionais no desenvolvimento de fármacos, esta estratégia é rápida e econômica. De forma geral, a estratégia de reposicionamento de fármacos consiste em três tipos de abordagens: abordagens computacionais, abordagens experimentais e abordagens mistas (XUE et al., 2018).

Neste contexto, temos as estatinas, fármacos que inibem a síntese de colesterol, tendo como alvo a enzima HMG-CoA redutase, sendo utilizado no controle da hipercolesterolemia. Ultimamente, além do uso no tratamento da hipercolesterolemia, surgiram outros possíveis usos terapêuticos para as estatinas, como o uso no controle de doenças cardiovasculares e no tratamento de desordens inflamatórias e imunológicas (JAIN; RIDKER, 2005).

Para avaliarmos a conservação da enzima HMG-CoA redutase de *M. corti*, realizamos o alinhamento múltiplo com a sequência de aminoácidos de *M. corti* e as sequências de aminoácidos da HMG-CoA redutase de outros cestódeos. Este alinhamento múltiplo mostrou que a sequência da enzima de *M. corti*, como esperado, é altamente conservada (resíduos 394-740) quando comparada com a de outros cestódeos, como *E. granulosus*, *E. canadensis*, *E. multilocularis*, *T. solium*, *T. saginata*, *T. asiática* e *T. multiceps*. Desta forma, é esperado que os resultados obtidos em *M. corti* possam ser extrapolados para outros cestódeos de relevância médica e veterinária.

Uma comparação da sequência de aminoácidos da HMG-CoA redutase de diferentes organismos, revelou duas classes distintas da enzima: enzimas de classe I e II (BOCHAR; STAUFFACHER; RODWELL, 1999), onde a sequência de aminoácidos de porções catalíticas são bem conservadas dentro de cada classe. A comparação da sequência de aminoácidos da enzima HMG-CoA redutase humana com a sequência da enzima HMG-CoA redutase de *M. corti* no alinhamento múltiplo, mostrou, que a sequência de aminoácidos da porção catalítica da enzima (resíduos 460-888) é conservada.

A estrutura do modelo McosHMG8 mostrou-se similar com a organização da estrutura dos domínios da enzima HMG-CoA redutase humana (ISTVAN et al., 2000). No modelo gerado foi possível identificar as regiões dos domínios: N-domínio (resíduos 248-313), L-domínio (resíduos 314-376 e 480-641), S-domínio (resíduos 377-467) e a identificação da região do cis-

loop (resíduos 468-480) que contém um cis-peptídeo entre os resíduos C474 e T475, essencial na formação do sítio de ligação da enzima HMG-CoA redutase.

As estatinas inibem a enzima HMG-CoA redutase por competição, ligando-se ao sítio de ligação da enzima, impedindo a ligação à HMG-CoA (ISTVAN; DEISENHOFER, 2001). Estes fármacos possuem em sua estrutura uma porção semelhante à HMG-CoA, e nesta fração semelhante estão ligados grupos hidrofóbicos rígidos. A especificidade e a ligação forte das estatinas com a HMG-CoA redutase dá-se pelo número de interações (forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio) entre estes inibidores e a enzima. De acordo com o *docking* a sinvastatina interage com o modelo McosHMG8 por meio de três ligações de hidrogênio, enquanto que a enzima HMG-CoA redutase humana interage com este fármaco por meio de oito ligações de hidrogênio. A sinvastatina realiza poucas interações com o modelo McosHMG8, e isto pode implicar na diminuição da especificidade e afinidade do fármaco com a enzima e resultar em uma ligação fraca. Mas as interações realizadas são na porção do fármaco que é semelhante à HMG-CoA e com os resíduos Lys521 e Asn543 da cadeia A e Ser470 da cadeia B do modelo McosHMG8, indicando a inibição da enzima pela sinvastatina.

As estatinas têm sido exploradas para possíveis tratamentos de doenças parasitárias, incluindo a tripanossomíase humana africana, a doença de chagas e a malária (ANDERSSON; LÖW; BAKHIET, 2009; PARQUET et al., 2010). Em estudos recentes, as estatinas também foram exploradas como possível tratamento para a esquistossomose, onde foi observado que a sinvastatina causou a morte de esquistossômulos e adultos de *S. mansoni* (ROJO-ARREOLA et al., 2014).

Os resultados dos ensaios *in vitro* em tetratídeos de *M. corti* mostrou que o fármaco, nas concentrações 100 μ M e 150 μ M causa a diminuição da mobilidade dos tetratídeos a partir de 72h de tratamento, o que pode estar indicando diminuição na viabilidade dos tetratídeos. Com 120h de tratamento nestas concentrações, os tetratídeos apresentaram sinais de degradação, como a formação de bolhas no tegumento. Trabalhos anteriores mostraram que a inibição da via do mevalonato pelo tratamento com as estatinas (incluindo a sinvastatina) podem estimular uma resposta adaptativa, como o aumento compensatório nos níveis da HMG-CoA redutase e consequentemente a redução parcial do efeito (MACIEJAK et al., 2013), o que ajudaria a entender o motivo de não ter sido observado nos tetratídeos efeitos mais agudos, como a morte dos parasitos.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste estudo, foram analisadas *in silico* as formas de interação da enzima HMG-CoA redutase de *M. corti* com a sinvastatina, e o seu efeito na viabilidade de tetratídeos de *M. corti* em cultivo *in vitro*. Os resultados mostram que a sinvastatina interage com os resíduos Lys521 e Asn543 da cadeia A e Ser470 da cadeia B no modelo McosHMG8, o que pode estar indicando a inibição da enzima. No ensaio *in vitro*, foi observado que com 120 h de tratamento com a sinvastatina, os tetratídeos apresentam sinais de degradação, indicando o potencial da sinvastatina como anti-helmíntico. Novos experimentos computacionais de *docking* são necessários para melhorar a predição da forma de interação da sinvastatina com McosHMG8. Realizar novos ensaios *in vitro* e ensaios mais específicos para avaliarmos se a sinvastatina está diminuindo a mobilidade e a viabilidade dos tetratídeos durante o tratamento. Além disso, será importante analisar os níveis de HMG-CoA redutase, usando-se anticorpos específicos

para a HMG-CoA redutase e RT-PCR para avaliar se o tratamento com a sinvastatina está estimulando um aumento compensatório nos níveis da enzima e reduzindo os efeitos do fármaco nestes parasitos. Também será importante realizar experimentos computacionais de *docking* com outras estatinas (fluvastatina e lovastatina) no modelo McoSHMG8 para analisar as interações, *in silico*, destes inibidores com o modelo e testar *in vitro* estes inibidores para avaliar os efeitos na viabilidade de tetratirídeos de *M. corti*.

8. REFERÊNCIAS

ALVAREZ, J. I. et al. *Mesocestoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. **Parasitology**, 137(3): 359-372, 2010.

ANDERSSON, M.; LÖW, P.; BAKHIET, M. Lovastatin Inhibits Interferon- γ -Induced *Trypanosoma brucei brucei* Proliferation: Evidence for Mevalonate Pathway Involvement. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, 16 (6): 435–439, 2009.

ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. **Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs**. **Nature Reviews Drug Discovery**, 3(8):673-83, 2004.

BASIKA, T. et al. Transcriptomic profile of two developmental stages of the cestode parasite *Mesocestoides corti*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 229, p. 35–46, 1 abr. 2019.

BIAVA, M. F.; DAO, A.; FORTIER, B. Laboratory diagnosis of cystic hydatid disease. **World Journal of Surgery**, 25 (1): 10–14, 2001.

BOCHAR, D. A.; STAUFFACHER, C. V.; RODWELL, V. W. Sequence comparisons reveal two classes of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. **Molecular Genetics and Metabolism**, 66 (2): 122–127, 1999.

BRUNETTI, E.; KERN, P.; VUITTON, D. A. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. **Acta Tropica**, 114(1): 1-16, 2010.

CADAVID RESTREPO, A. M. et al. The landscape epidemiology of echinococcoses. **Infectious Diseases of Poverty**, 5:13, 2016.

CARDONA, G. A.; CARMENA, D. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. **Veterinary Parasitology**, 192(1-3):10-32, 2013.

COGHLAN, A. et al. Comparative genomics of the major parasitic worms. **Nature Genetics**, 51 (1): 163–174, 2019.

COLLINS, J. J. Platyhelminthes. **Current Biology**, 27(7): R252-R256, 2017.

COPPENS, I., AND COURTOY, P.-J. The Mevalonate Pathway in Parasitic Protozoa and Helminths. **Experimental Parasitology**, 82(1):76-85, 1996.

CRAIG, P. S. et al. Prevention and control of cystic echinococcosis. **Lancet Infectious Diseases**, 7(6):385-394, 2007.

DEMIERRE, M. F. et al. Statins and cancer prevention. **Nature Reviews Cancer**, 5(12): 930-942, 2005.

- FERREIRA, L. G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies **Molecules**, 20(7): 13384-13421, 2015.
- HIGUITA, N. I. A.; BRUNETTI, E.; MCCLOSKEY, C. Cystic Echinococcosis. **Journal of Clinical Microbiology** 54(3):518-23, 2016.
- ISTVAN, E. S. et al. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: Insights into regulation of activity and catalysis. **EMBO Journal**, 19 (5): 819–830, 2000.
- ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J. The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, 1529 (1-3): 9-18, 2000.
- ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA reductase, **Science** 292 (5519): 1160-1164, 2001.
- ITO, A.; BUDKE, C. M. Culinary delights and travel? A review of zoonotic cestodiasis and metacestodiasis. **Travel Medicine and Infectious Disease**, 12(6 Pt A): 582-591, 2014.
- JAIN, M. K.; RIDKER, P. M. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. **Nature reviews. Drug discovery**, 4 (12): 977–987, 2005.
- KOZIOL, U. Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes. **Experimental Parasitology**, 180: 84–100, 2017.
- LITTLEWOOD, D. T. J.; ROHDE, K.; CLOUGH, K. A. The interrelationships of all major groups of Platyhelminthes: Phylogenetic evidence from morphology and molecules. **Biological Journal of the Linnean Society**, 66 (1): 75–114, 1999.
- LUSTIGMAN, S. et al. A research agenda for helminth diseases of humans: The problem of helminthiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 6 (4): e1582, 2012.
- MA, D. L.; CHAN, D. S. H.; LEUNG, C. H. Drug repositioning by structure-based virtual screening. **Chemical Society Reviews**, 42(5):2130-41, 2013.
- MACIEJAK, A. et al. The effects of statins on the mevalonic acid pathway in recombinant yeast strains expressing human HMG-CoA reductase. **BMC Biotechnology**, 13: 68 , 2013.
- MANDAL, S.; MANDAL, D.M. Human cystic echinococcosis: Epidemiologic, zoonotic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 5 (4): 253–260, 2012.
- MARKOSKI, M. M. M. et al. In vitro segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. **The Journal of Parasitology**, 89 (1): 27–34, 2003.
- MEHLHORN, H. (Ed.). **Encyclopedia of parasitology**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York , 2008.
- MUTHYALA, R. Orphan/rare drug discovery through drug repositioning. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, 8 (3-4): 71-76, 2012.

- NAKAO, M. et al. State-of-the-art *Echinococcus* and *Taenia*: Phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. **Infection, Genetics and Evolution**, 10 (4): 444-452, 2010.
- NEVES, D. P. et al. Parasitologia Humana. **Atheneu**, p. 498, 2011.
- PARQUET, V. et al. Atorvastatin as a potential anti-malarial drug: in vitro synergy in combinational therapy with quinine against *Plasmodium falciparum*. **Malaria journal**, 9: 139, 2010.
- RAUTHAN, M.; PILON, M. The mevalonate pathway in *C. elegans*, *Lipids in Health and Disease*, 10: 243, 2011.
- ROJO-ARREOLA, L. et al. Chemical and genetic validation of the statin drug target to treat the helminth disease, schistosomiasis. **PLoS ONE**, 9(1) :e87594, 2014.
- SANGSTER, N. C.; COWLING, A.; WOODGATE, R. G. Ten Events That Defined Anthelmintic Resistance Research. **Trends in Parasitology**, 34 (7): 553-563, 2018.
- TSAI, I. J. et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. **Nature**, 496 (7443): 57–63, 2013.
- WU, C. H.; ARIGHI, C. N.; ROSS, K. E. **Protein Bioinformatics From Protein Modifications and Networks to Proteomics**. Editors Cathy H. Wu, Cecilia N. Arighi, Karen E. Ross. *Methods in Molecular Biology* 1558, Springer Protocols. Humana Press, 2017.
- XUE, H. et al. Review of drug repositioning approaches and resources. **International Journal of Biological Sciences**, 14 (10):1232-1244, 2018.
- ZAROWIECKI, M.; BERRIMAN, M. What helminth genomes have taught us about parasite evolution. **Parasitology**, 142: (S1): S85–S97, 2015.
- ZHENG, H. et al. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. **Nature Genetics**, 45 (10): 1168–1175, 2013.