

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

Trabalho de Conclusão de Curso

**Ensaio *in silico* com a enzima Niemann-Pick C1-Like 1
de duas espécies de cestódeos**

**Thom Pedroso Nunes
Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira
Co-orientador: Jefferson Camargo de Lima**

Porto Alegre, outubro de 2021

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

Trabalho de Conclusão de Curso

**Ensaio *in silico* com a enzima Niemann-Pick C1-Like 1
de duas espécies de cestódeos**

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.

Thom Pedroso Nunes
Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira
Co-orientador: Jefferson Camargo de Lima

Porto Alegre, outubro de 2021

CIP - Catalogação na Publicação

Pedroso Nunes, Thom
Ensaio in silico com a enzima Niemann-Pick C1-Like
1 de duas espécies de cestódeos / Thom Pedroso
Nunes. -- 2021.
26 f.
Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Reposicionamento de Fármaco. 2. Cestódeos. 3.
Parasitas. 4. Análises in silico. I. Bunselmeyer
Ferreira, Henrique, orient. II. Título.

Thom Pedroso Nunes

Ensaio in silico com a enzima Niemann-Pick C1-Like 1 de duas espécies de cestódeos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Aprovado em: Porto Alegre, 18 de novembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA:

Professor Doutor Henrique Bunselmeyer Ferreira, UFRGS

Nome e titulação do orientador

Instituição do orientador

Doutora Jéssica Andrade Paes, UFRGS

Nome e titulação do membro da banca

Instituição do membro da banca

Doutora Gabriela Prado Paludo, UFRGS

Nome e titulação do membro da banca

Instituição do membro da banca

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela orientação neste trabalho e, também, por ter me aceitado como aluno de iniciação científica no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Ao doutorando Jeferson Camargo de Lima, que, junto ao Prof. Henrique, me guiou ao longo de todo o trabalho, tirando todas as minhas dúvidas e me ensinando, e que me ajudou muito na redação do trabalho. Agradeço por toda disposição e paciência para me ajudar.

RESUMO

Cestódeos são parasitas causadores de doenças infecciosas em humanos e animais, que causam prejuízo de bilhões de dólares ao ano no mundo, na saúde humana, saúde veterinária e na pecuária. Atualmente, as principais formas de tratamento de infecções humanas por formas larvais desses parasitos são baseadas no uso de fármacos da classe dos benzimidazóis, muitas vezes pouco eficiente, e por intervenções cirúrgicas. Isso faz com que haja demanda crescente de novas formas de tratamento e de novos fármacos. Uma importante estratégia, que pode ser usada, e envolve menos investimento do que o desenvolvimento de um fármaco com uma nova fórmula, é o reposicionamento de fármacos já regulamentados por órgãos de saúde no mundo, e já usados em humanos ou animais. Nesse contexto, temos a ezetimiba, um fármaco já regulamentado e usado em humanos para o controle de dislipidemias, e que poderia ser possivelmente empregado no tratamento de infecções por cestódeos, uma vez que esses organismos são dependentes da absorção do colesterol proveniente do hospedeiro para sua sobrevivência. Esses organismos possuem enzima ortóloga à enzima humana Niemann-pick C1-Like 1 (NPC1L1, alvo do fármaco ezetimiba), que também estão envolvidas no transporte de colesterol para dentro das células. A partir disso, foi feita uma série de análises *in silico* preliminares, para avaliar o grau de conservação entre as proteínas de cestódeos e a humana, o que indicaria inicialmente a possibilidade da alternativa de reposicionamento do fármaco inibidor. A sequência da NPC1L1 humana foi recuperada do banco de dados UniProt e usada como sonda para busca *in silico* de ortólogas de helmintos parasitas no banco de dados WormBase Parasite. A partir disso, foram identificadas 4 enzimas ortólogas da NPC1L1 humana nas duas espécies de cestódeos disponíveis para análises *in vitro*, *Mesocestoides corti*, modelo para estudo em cestódeos, e *Echinococcus granulosus*. Também foram identificados os genes e os transcritos correspondentes. Foi observado que o número de éxons, o tamanho dos transcritos e o tamanho das proteínas em resíduos de aminoácidos se assemelha bastante entre humanos e as duas espécies analisadas. Além disso, todas as proteínas apresentavam os domínios de interesse para análise (domínios N-terminal e domínio sensível a colesterol), além de outros domínios semelhantes a proteína humana, anotados em bancos de dados de famílias de proteínas. Após, usando as sequências das proteínas dos parasitos e a humana, foi feito um alinhamento múltiplo no software MAFFT7 e buscou-se o trecho, que de acordo com a literatura, seria o de interação entre o fármaco e a enzima humana. A porção mostrou boa identidade entre as três e um bom score do alinhamento (matriz BLOSUM62). Ainda foram recuperadas do WormBase Parasite sequências das proteínas de cestódeos potencialmente ortólogas, que apresentassem semelhanças em número de aminoácidos e em domínios preditos com as das duas espécies já analisadas e a humana. Usando-se essas sequências, e as sequências de *Mus musculus* e *Drosophila melanogaster* (grupo externo), foi construída uma árvore filogenética. A árvore mostrou a conservação esperada, com a separação correta dos grupos, com exceção dos gêneros *Echinococcus* e *Hymenolepis*, que foram agrupados de forma irregular (principalmente as duas proteínas parálogas de *E. granulosus*), o que poderia ser devido a problemas na anotação das sequências no banco de dados de onde foram recuperadas, pois essas sequências ainda não foram revisadas manualmente. Todos resultados das análises realizadas indicaram inicialmente a conservação da enzima dos parasitos e que seria viável a realização de mais estudos de reposicionamento de fármaco, fazendo análises mais aprofundadas *in silico* e *in vitro*.

Palavras chave: reposicionamento de fármaco; *E. granulosus*; *M. corti*; cestódeos; ezetimiba

ABSTRACT

Cestodes are parasites that cause infectious diseases in humans and animals, which causes the loss of billions of dollars a year in the world, in human health, veterinary health and livestock. Currently, the most used forms of treatment for infection in humans by the larval form of these parasites, is based on the use of drugs from benzimidazole class and surgical intervention, which is often inefficient. This causes the increase of demand for new forms of treatment and new drugs. An important strategy, which can be used, and requires less investment than the development of drugs with a new formula, is the repositioning of drugs that are already regulated by health agencies around the world, and are already used in humans or animals. In this context, we have ezetimibe, a drug that is already regulated and used in humans to control dyslipidemia, and which could possibly be used in the treatment of cestode infections, since these organisms are dependent on the absorption of cholesterol from the host for their survival. These organisms have the enzyme orthologs to the human enzyme Niemann-pick C1-Like 1 (NPC1L1, target of ezetimibe), which are also involved in the transport of cholesterol into the cells. From this, a series of preliminary *in silico* analyzes were carried out, to evaluate the degree of conservation between the proteins of cestodes and the human, which would initially indicate a possibility of the alternative of repositioning the inhibitor drug. The human NPC1L1 sequence was retrieved from the UniProt database and used as a probe for *in silico* search for helminth parasite orthologs in the WormBase Parasite database. From this, four orthologous enzymes of human NPC1L1 were identified in two species of cestodes available for *in vitro* analysis, *Mesocestoides corti*, a model organism for study in cestodes, and *Echinococcus granulosus*. The corresponding genes and transcripts were also identified. It was observed that the number of exons, the size of transcripts and the size of proteins in amino acid residues are very similar between humans and the two species analyzed. In addition, all proteins had the domains of interest for analysis (N-terminal domain and cholesterol-sensitive domain), and other similar domains to those of human protein, annotated in protein family databases. Afterwards, using the sequences of the proteins of the parasites and the human, a multiple alignment was made in the MAFFT7 software, and the patch, which according to the literature, would be the interaction between the drug and the human enzyme, was searched. The patch showed good identity between the three and a good alignment score (BLOSUM62 matrix). Sequences of potentially orthologous cestode proteins that presented similarities in number of amino acids and in predicted domains, with those of the two species already analyzed and the human, were also recovered from WormBase Parasite. Using these sequences, plus the sequences of *Mus musculus* and *Drosophila melanogaster* (outside group), a phylogenetic tree was constructed. The tree showed the expected conservation, with the correct separation of groups, with the exception of the genera *Echinococcus* and *Hymenolepis*, which were irregularly grouped (mainly the two paralogous proteins of *E. granulosus*), which could be due to problems in annotation of the sequences in the database from which they were retrieved, as these sequences have not yet been manually reviewed. All results of the analyzes carried out initially indicated the conservation of the enzyme in the parasites and that it would be feasible to carry out more drug repositioning studies, making more in-depth analyzes *in silico* and *in vitro*.

Key words: drug repositioning; *E.granulosus*; *M.corti*; cestodes; ezetimibe

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Características gerais de cestódeos	8
1.2. Equinococoses.....	9
1.3. <i>Mesocestoides corti</i> como organismo modelo	10
1.4. Metabolismo de colesterol em cestódeos e reposicionamento de fármacos	11
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. Objetivo geral.....	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. Recuperação de dados sobre os genes e as enzimas	14
4.2. Alinhamento e construção da árvore filogenética.....	14
4.3. Alinhamento das enzimas de <i>E.granulosus</i> e humana	15
5. RESULTADOS.....	16
5.1. Possíveis NPC1L1's codificadas pelos genomas de <i>M.corti</i> e <i>E.granulosus</i>	16
5.2. Alinhamento do possível segmento de interação com a ezetimiba	18
5.3. Árvore filogenética das enzimas	20
6. DISCUSSÃO.....	21
7. CONCLUSÃO	22
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1.INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais de cestódeos

O filo Platyhelminthes é composto por organismos (Platelmintos) que se caracterizam pelo corpo achatado dorsoventralmente, simetria bilateral e ausência de celoma (COLLINS, 2017). Com espécies de vida livre ou parasitária os platelmintos são capazes de ocupar uma vasta gama de habitats e hospedeiros (no caso dos parasitas). Grande parte do filo é de espécies parasitas, que representam cerca de 80% do filo, vivendo como ecto ou endoparasitas em outros animais (ROMIG et al., 2017).

Classicamente, o filo é separado em quatro classes: Turbellaria, Monogenea, Trematoda e Cestoda. A classe Turbellaria é constituída por planárias de vida livre, e as outras três classes são compostas por organismos parasitas, e estão compreendidas no clado monofilético Neodermata (KOZIOL, 2017). Organismos das classes Trematoda e Cestoda são causadores de 4 das 20 doenças tropicais negligenciadas, da lista da Organização Mundial da Saúde (OMS). Parasitos da classe Cestoda, por sua vez, são responsáveis por duas destas quatro doenças negligenciadas causadas por platelmintos parasitas.

Cestódeos (organismos da classe cestoda) são vermes que se caracterizam pela extremidade anterior diferenciada em uma estrutura contendo órgãos de fixação (o escólex) e um corpo alongado em forma de fita (estróbilo). O estróbilo é formado por proglótides (unidades reprodutivas hermafroditas que se autofecundam) durante a fase adulta (OLSON et al., 2001). São todos parasitas de vertebrados e apresentam um ciclo de vida complexo envolvendo mais de um estágio de vida, o que facilita sua transmissão entre hospedeiros (COLLINS, 2017; OLSON et al., 2001).

Os ciclos de vida de cestódeos incluem a infecção de pelo menos dois hospedeiros (intermediário e definitivo). Após ser ingerida por um hospedeiro intermediário, a oncosfera (embrião hexacanto envolvido por dois envelopes embrionários), se fixa no lume das viscerais. O embrião penetra as vísceras para chegar aos órgãos do hospedeiro, onde irá se desenvolver no metacestódeo (estágio larval), que se prolifera assexuadamente, gerando formas pré-adultas (THOMPSON, 2017). No hospedeiro definitivo, que se infecta após a ingestão da forma cística, o parasito se fixa no lume intestinal e se desenvolve no estágio adulto, em que as proglótides autofecundadas da porção mais distal, irão produzir ovos e vão ser liberadas nas fezes (WEBB; CABADA, 2017).

Uma das grandes adaptações à vida parasita é o tegumento sincicial dos cestódeos, responsável por protegê-los do sistema imunológico do hospedeiro e desempenhando papel essencial na absorção dos nutrientes providos pelo hospedeiro, uma vez que os cestódeos são desprovidos de sistema digestório. A absorção de nutrientes, realizada pela epiderme altamente especializada, é fundamental, pois esses

organismos possuem deficiências em vias de síntese de algumas moléculas essenciais à própria sobrevivência (TSAI et al., 2013).

1.2 Equinococoses

As equinococoses são causadas por espécies de cestódeos do gênero *Echinococcus*. O *Echinococcus granulosus*, de distribuição mundial, causa a equinococose cística, ao passo que o *Echinococcus multilocularis*, restrito ao hemisfério norte, causa a equinococose alveolar.

A equinococose cística causa perdas anuais de 3 bilhões de dólares, que incluem despesas com tratamento médico de pacientes humanos e perdas na pecuária. (HIGUITA; BRUNETTI; MCCLOSKEY, 2016). Na América do Sul, a distribuição da doença é dada conforme a densidade de produção de gado, hospedeiro intermediário do parasito. É endêmica na Argentina, Chile, Peru, Uruguai e região sul do Brasil (PAVLETIC et al., 2017). Ainda, Bolívia, Colômbia, Equador e Venezuela também apresentaram casos de equinococose cística, tanto em rebanhos quanto em humanos, ao longo dos últimos anos

Isto posto, o Rio Grande do Sul, estado com o maior rebanho de ovinos e o 6º maior rebanho de bovinos do país (Atlas Socioeconômico do RS), apresenta maiores taxas de ocorrência do Brasil de equinococose cística nas espécies animais e no homem (HOFFMANN; MALGOR; RUE, 2001). De acordo com dados da Secretaria de Saúde, no período de 1979 a 2013, ocorreram 133 óbitos por equinococose no RS. (PAVLETIC et al., 2017).

A propagação da equinococose cística é dada geralmente a partir da ingestão de restos e vísceras de ovinos e bovinos, contaminadas com cistos hidáticos, por cães domésticos que vivem por perto da criação de animais e outros carnívoros (HIGUITA; BRUNETTI; MCCLOSKEY, 2016). Os cistos eclodem em seus intestinos, liberam protoscólices que maturam em indivíduos adultos, e os adultos liberam proglótides contendo ovos do parasito com as fezes. Por sua vez, humanos são infectados a partir da ingestão acidental de ovos do parasito pelo alimento ou água contaminada ou contato direto com o cão contaminado (THOMPSON, 2017). O desenvolvimento dessa zoonose em humanos pode passar por longos períodos assintomáticos, só sendo percebido quando ocorre alguma complicação ou ao acaso, em exames de imagem (HIGUITA; BRUNETTI; MCCLOSKEY, 2016). Com o crescimento da forma larval do parasito (cisto hidático), se não for administrado o tratamento correto, a infecção pode causar grave morbidade e morte (DIAS et al., 2013).

Conforme o grau de evolução da enfermidade e o local de infecção, pode ser indicada a remoção cirúrgica ou a punção do cisto, caso esteja alocado em orientação favorável (HIGUITA; BRUNETTI; MCCLOSKEY, 2016). O tratamento farmacológico recomendado para os hospedeiros definitivos –

canídeos – é o praziquantel, capaz de paralisar a musculatura do parasito adulto, causando sua liberação pelo hospedeiro (KERN et al., 2017). Para os seres humanos, são administradas fármacos da classe dos benzimidazóis, que atuam impedindo a polimerização da β -tubulina, proteína de citoesqueleto importante para a formação de microtúbulos nas células, impedindo divisão celular do organismo (SILES-LUCAS et al., 2018; THOMPSON, 2017). Essas fármacos possuem taxa de cura moderada, equivalente a 28,5 a 58% dos pacientes, e podem contribuir para o desenvolvimento de resistência parasitária (MIHMANLI et al., 2016).

As opções terapêuticas disponíveis atualmente para a equinococose e outras cestodíases, assim como para outras doenças tropicais negligenciadas, são muito limitadas e apresentam uma série de problemas, tais como baixa eficácia, elevada toxicidade e a emergência de cepas resistentes (DIAS et al., 2013). Apesar da quimioterapia com benzimidazóis ser a mais comum e garantida desde a década de 80 para o tratamento de equinococoses, já foram testados muitos outros compostos que se provaram ineficientes (HIGUITA; BRUNETTI; MCCLOSKEY, 2016). Assim, existe uma demanda por novas formas de tratamentos que sejam mais eficientes.

1.3 *Mesocestoides corti* como organismo-modelo

M. corti apresenta um ciclo de vida que envolve um hospedeiro definitivo (carnívoro) e dois intermediários. A identidade do primeiro hospedeiro intermediário ainda não está bem estabelecida, sugerindo que seja um artrópode coprófago. No primeiro hospedeiro intermediário, a oncosfera, após a eclosão, originará um embrião hexacanto que penetra nos tecidos do hospedeiro, onde se desenvolve em uma larva procercóide. No segundo estágio larval, a larva, denominada tetratrídeo, se desenvolve como um cisto no fígado ou, como larva, no peritônio do segundo hospedeiro intermediário (geralmente mamíferos, pássaros, répteis ou anfíbios). Nessas regiões o tetratrídeo se reproduz assexuadamente e infecta todo o tecido do hospedeiro. Ao ser ingerido posteriormente pelo hospedeiro definitivo carnívoro, o tetratrídeo sofre um processo de estrobilização e se desenvolve no verme adulto (CAMARGO DE LIMA et al., 2018).

Em laboratório, devido à capacidade de reprodução assexuada do tetratrídeo, é possível manter *in vivo* os parasitos por meio de sucessivas passagens em modelos experimentais como ratos e camundongos. Além disso, já está disponível um protocolo para a indução da estrobilização *in vitro* de *M. corti*, o que permite o acompanhamento de parte do ciclo de vida do *M. corti* (MARKOSKI et al., 2003). Desta forma, *M. corti* é utilizado para o estudo diferentes aspectos relacionados a biologia básica de cestódeos bem como em outras aplicações.

1.4 Metabolismo do colesterol em cestódeos e o reposicionamento de fármacos

O processo evolutivo de adaptação ao parasitismo levou à redução do número de vias metabólicas dos cestódeos, podendo estes obter substâncias diretamente do metabolismo do hospedeiro, tornando-se redundante sintetizá-las paralelamente (TSAI et al., 2013). Assim, diversas enzimas chave em processos metabólicos estão ausentes nos genomas de cestodas parasitas, enquanto genes envolvidos na absorção de nutrientes estão aumentados (ZAROWIECKI; BERRIMAN, 2015).

Em relação ao metabolismo de lipídeos é bem estabelecido que *Echinococcus* spp., por exemplo, é incapaz de sintetizar ácidos graxos e colesterol *de novo*, mas é capaz de formar lipídeos complexos a partir de precursores obtidos do hospedeiro (ZHENG et al., 2013). É de se esperar que proteínas envolvidas em processos de captação de lipídeos sejam essenciais para a sobrevivência do parasito, portanto também são proteínas de interesse para análise como alvo terapêutico. Algumas proteínas já são descritas como importantes no transporte de lipídios, como o antígeno B e as FABPs (*fatty acid binding protein*) (TSAI et al., 2013). Essas proteínas são encontradas em produtos de secreção/excreção do cisto hidático e sua importância na relação parasito-hospedeiro já vem sendo estudada. Por outro lado, proteínas de transporte transmembrana que possam estar envolvidas na translocação de lipídeos para dentro dos tecidos do parasito ainda são pouco conhecidas. Dentre esses transportadores, aqueles associados ao transporte de colesterol são alvos interessantes devido à importância do colesterol não só na composição das membranas biológicas do parasito, como também em outras questões energéticas.

Análises *in silico* identificaram nos genomas de *M. corti* e de outro cestódeos (*E. granulosus* e *E. multilocularis*, por exemplo) proteínas contendo características estruturais similares à da Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) de humanos. Além disso, essas proteínas foram identificadas em análises proteômicas do metacestódeo de *E. granulosus* (MONTEIRO et al., 2010). A NPC1L1 é uma enzima transmembrana presente no epitélio intestinal que atua na absorção de colesterol da dieta. A NPC1L1 é alvo para tratamento de hipercolesterolemia em humanos por meio do bloqueio da sua função com o fármaco ezetimiba. O efeito da ezetimiba foi testado em *Leishmania* spp. e se mostrou ativo tanto contra as formas livres, promastigotas, quanto contra as formas intracelulares, amastigotas (ANDRADE-NETO et al., 2016). Essa dependência do colesterol do hospedeiro, torna a via de absorção e metabolismo uma vulnerabilidade do organismo, e um potencial alvo para um tratamento quimioterápico. Anteriormente, já foi sugerido que estatinas, usadas para tratar hipercolesterolemia em humanos, poderiam ser exploradas no tratamento de doenças parasitárias (ROJO-ARREOLA et al., 2014). Apesar de não sintetizarem colesterol *de novo*, os cestódeos ainda possuem intacta a via do mevalonato, responsável pela biossíntese de uma variedade isoprenoides e esteróis, característica que é mantida ao longo de todos os helmintos.

O progresso no desenvolvimento de novos anti-helmínticos mais seguros e eficazes é limitado. As cestodíases são doenças com uma baixa letalidade (mas com alta morbidade) que afetam países em desenvolvimento e assim não chamam a atenção da indústria farmacêutica visto que teriam pouco retorno financeiro (KLUG; GELB; POLLASTRI, 2016). Baseado nisso, o reposicionamento de fármacos é uma estratégia que pode superar essas limitações. Essa abordagem baseia-se em encontrar novas indicações terapêuticas para fármacos já existentes e disponíveis no mercado, levando em conta conhecimentos da biologia e bioquímica do parasito para facilitar a seleção desses medicamentos (SIZAR; TALATI, 2020). Neste contexto, visto que cestódeos são deficientes em algumas enzimas na via do mevalonato, responsável pela síntese de colesterol, eles precisam captar o colesterol do hospedeiro (ZAROWIECKI; BERRIMAN, 2015), a inibição desta enzima nos parasitos pode comprometer vias metabólicas importantes e ter consequências na sobrevivência desses organismos. Baseando-se nisso, a ezetimiba seria uma opção para o reposicionamento de fármacos como potencial anti-helmíntico (KOSOGLOU et al., 2005).

2. JUSTIFICATIVAS

Como não há tanto investimento em tratamentos para a forma larval das cestodíases é necessário que se façam mais estudos sobre as possibilidades nessa área.

Boas alternativas para tratamento das cestodíases, e que demandariam menos tempo e investimento, são estudos sobre reposicionamento de fármacos já regulamentados para uso humano ou veterinário. A ezetimiba, um fármaco usado para tratamento de dislipidemias em humanos, tem potencial terapêutico contra cestódeos, por estes dependerem da absorção de colesterol dos hospedeiros.

A homologia de enzimas transportadora de colesterol NPC1L1 de cestódeos com a enzima humana NPCL1L1 e o grau de similaridade da região de interação entre enzima e a ezetimiba, tornam este fármaco potencialmente reposicionável como um anti-helmíntico. Se faz então inicialmente necessária uma melhor avaliação *in silico* da conservação evolutiva da enzima, de sua estrutura molecular e de sua forma de interação com a ezetimiba. Os resultados deste tipo de análise deverão subsidiar posteriores estudos de eficácia *in vitro* da ezetimiba em espécie-modelo (*M. corti*). Com base nos resultados esperados, a ezetimiba poderá ter confirmado seu potencial reposicionamento como anti-helmíntico eficaz contra *Echinococcus* spp. e outros cestódeos e helmintos de importância médica e veterinária.

3. OBJETIVOS:

3.1. Objetivo geral

Avaliar o reposicionamento da ezetimiba, fármaco inibidor da enzima NPC1L1, como anti-helmíntico.

3.2. Objetivo específico

Avaliar o grau de conservação evolutiva da enzima NPC1L1 entre helmintos parasitas e seus respectivos hospedeiros, com primeira etapa para a proposição da ezetimiba como potencial anti-helmíntico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 Recuperação de dados sobre genes codificadores de NPCL1

O primeiro passo foi recuperar uma sequência da enzima humana NPCL1 (hNPC1L1- *UniProt*; ID:Q9UHC9, Isoforma 1- *canônica*), já conhecida por ser responsável pelo transporte de colesterol em humanos e por ser alvo do fármaco ezetimiba. A hNPC1L1 foi utilizada como referência em todo o restante do trabalho. Tendo a sequência da hNPC1L1 como sonda, usou-se o banco de dados *WormBase Parasite* (<https://parasite.wormbase.org/index.html>) para recuperar informações básicas sobre a estrutura dos possíveis genes codificadores de NPC1L1's nos genomas de *M. corti* e *E. granulosus*.

A busca foi realizada usando a ferramenta BLASTP usando-se os seguintes parâmetros:

*Sequence data= Protein; Search against= Platyhelminthes>Cestoda(tapeworms), Protein database; Search tool= BLASTP, Search sensitivity= Normal; Scoring options- Dropoff=0, Scoring matrix= BLOSUM62, Penalty for opening a gap= 11, Penalty for extending a gap= 1, *Perform alignment using gaps*

4.2 Alinhamento e construção de árvore filogenética

Para analisar a possível conservação entre sequências de aminoácidos das enzimas de *M. corti*, *E. granulosus* e outros cestódeos, foi construída uma árvore filogenética. As sequências de *M. corti* ID: , MCU_005849-RA e MCU_005849-RB e , *E. granulosus* IDs: EgrG_001107700 e EgrG_001107950, *Echinococcus canadensis* ID: maker-E.canG7 contigs 5962-augustus-gene-0.2-mRNA-1; *E. multilocularis* ID: EmuJ_001107700.1 (espécies do mesmo gênero de *E. granulosus*) e de outros cestódeos (*Taenia saginata* ID: TSAAs00030g04723m00001, *Hymenolepis diminuta* ID: HDID_0000850401-mRNA-1, e *Hymenolepis microstoma* ID: HmN_003003500) foram recuperadas do banco de dados *WormBase Parasite* (<https://parasite.wormbase.org/index.html>). As sequências das enzimas ortólogas humana (hNPC1L1. ID: Q9UHC9), de *M. musculus* (ID: Q6T3U4) e de *D. melanogaster* (ID: Q9VRC9) foram recuperadas do banco de dados *UniProt* (<https://www.uniprot.org/>). Buscou-se selecionar sequências de aminoácidos de tamanho semelhantes as dos parasitos que seriam usados no experimento. Para realizar o alinhamento das enzimas e construção da árvore, foi usado o software MAFFT7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

Os seguintes parâmetros foram usados para o alinhamento: *Uppercase/Lower case= Aminoacid; Advanced settings: Strategy= Auto; *Try to align gappy regions anyway; Scoring matrix for aminoacid*

sequence= BLOSUM62; Gap opening penalty: 1.53; Offset value: 0; Guide tree= default, Output guide tree;Mafft-homologs= Use UniRef50

Os seguintes parâmetros foram usados para a construção da árvore, após o alinhamento: *Method= Neighbor-joining-conserved sites; Substitution model= ITT; Heterogeneity among sites= Ignore; Bootstrap ON= 1000*

4.3 Alinhamento das enzimas NPC1L1 de *E. granulosus* e humana

Utilizando também o software MAFFT7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), foi realizado um alinhamento múltiplo entre as enzimas de *E. granulosus* e a enzima humana, usando os mesmos parâmetros do alinhamento usado para construção da árvore. O resultado foi visualizado no software *Jalview*, buscando-se verificar a conservação e similaridade do trecho predito como de interação entre a o fármaco e a enzima humana, conforme a bibliografia (WEINGLASS et al., 2008).

5.RESULTADOS

5.1 Identificação de genes potencialmente codificadores de NPC1L1 nos genomas de *M. corti* e *E. granulosus*

No total foram recuperados 4 genes diferentes, 2 codificados no genoma de *M. corti*, MCU_005849-RA (*McNPC1L1-1A*) e MCU_005849-RB (*McNPC1L1-1B*); e outros 2 codificados no genoma de *E. granulosus*, EgrG_001107700 (*EgNPC1L1-1*) e EgrG_001107950 (*EgNPC1L1-2*). Posteriormente, analisamos os tamanhos das sequências em pares de bases (pb), número de íntrons/éxons e os domínios presentes nas sequências deduzidas de aminoácidos (aa). Usamos como referência a hNPC1L1 (5063 pb, 20 íntrons, 20 éxons e 1359 aa).

O gene que codifica para a *McNPC1L1-1A* possui 4304 pb, 20 íntrons e 21 éxons, e a proteína predita possui 1373 aa (Figura 1).

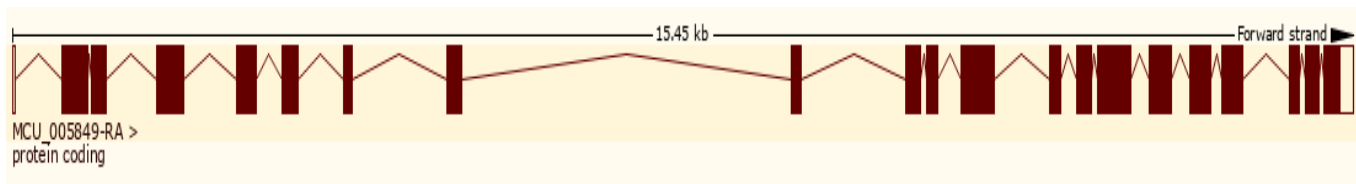


Figura 1: Visão geral da organização de íntrons e éxons no gene da isoforma *McNPC1L1-1A*. Os íntrons são representados pelas linhas, totalizando 20 íntrons, por sua vez, os éxons são representados pelos retângulos pintados, totalizando 21 éxons, 4304 pb e 1373 aa.

Por outro lado o gene que codifica para a isoforma *McNPC1L1-1B* possui 4323 pb, 18 íntrons e 19 éxons, e a proteína predita para este gene possui 1282 aa (Figura 2).

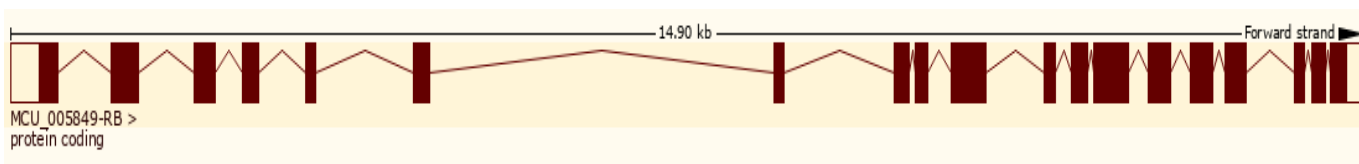


Figura 2: Visão geral da organização de íntrons e éxons no gene da isoforma *McNPC1L1-1B*. Os íntrons são representados pelas linhas, totalizando 18 íntrons, por sua vez, os éxons são representados pelos retângulos pintados, totalizando 19 éxons, 4323 pb e 1282 aa.

Além disso, analisamos as características topológicas preditas para a isoforma *McNPC1L1-1A* em diferentes bancos, por meio do banco de dados WormBase ParaSite, onde identificamos diferentes domínios e famílias (Figura 3).

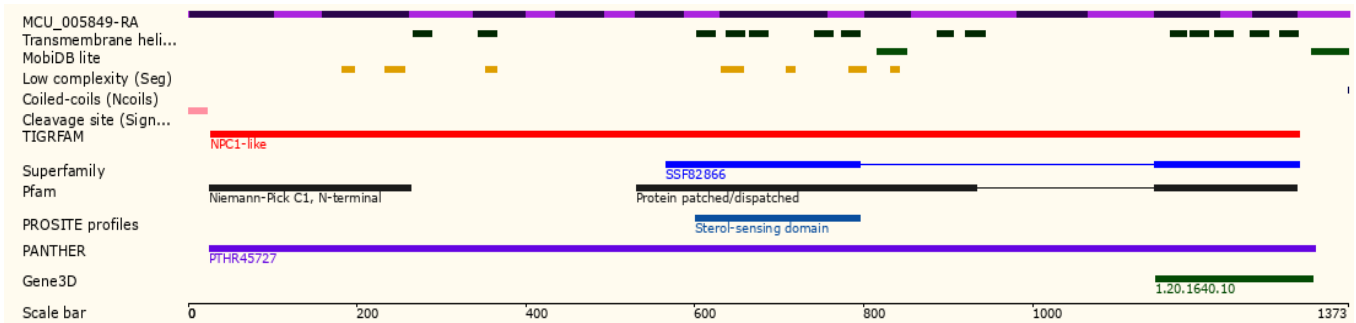


Figura 3: Ilustração das diferentes características topológicas identificadas para a isoforma McNPC1L1-1A. As diferentes cores indicam as características preditas pelos diferentes bancos de dados. As predições englobam (mas não se limitam) topologia, domínios e famílias.

Resultados semelhantes foram obtidos para a isoforma McNPC1L1-1B (Figura 4).

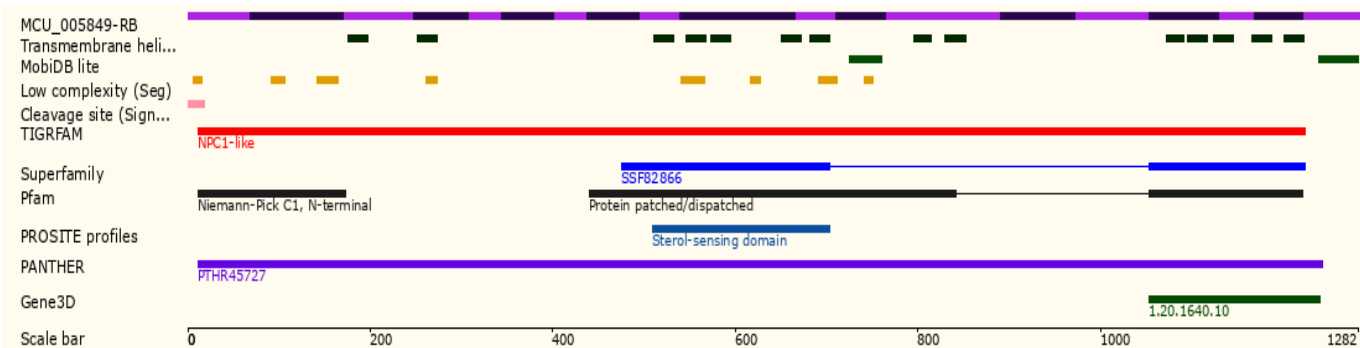


Figura 4: Ilustração das diferentes características topológicas identificadas para a isoforma McNPC1L1-1B. As diferentes cores indicam as características preditas pelos diferentes bancos de dados. As predições englobam (mas não se limitam) topologia, domínios e famílias.

Também realizamos buscas no genoma de *E. granulosus*, onde identificamos dois genes. O que condiz para a isoforma EgNPC1L1-1 possui 4128 pb, 20 íntrons e 21 éxons, e a proteína predita possui 1375 aa (Figura 5).

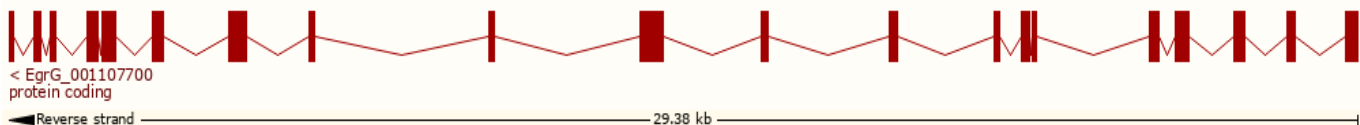


Figura 5: Visão geral da distribuição dos íntrons e éxons da isoforma EgNPC1L1-1. Os íntrons são representados pelas linhas, totalizando 19 íntrons, por sua vez, os éxons são representados pelos retângulos pintados, totalizando 20 éxons, 4128 pb e 1375 aa.

Por outro lado, a isoforma *EgNPC1L1-2* possui 4101 pb, 20 íntrons e 21 éxons, e a proteína predita possui 1366 aa (Figura 6).

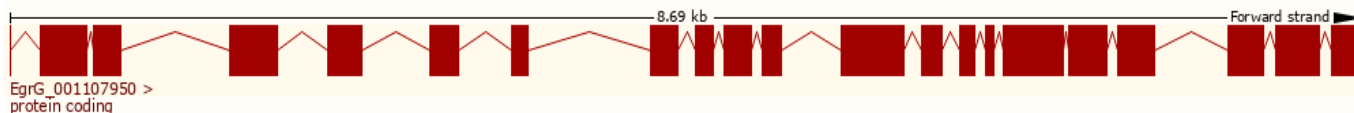


Figura 6: Visão geral da distribuição dos íntrons e éxons da isoforma EgNPC1L1-2. Os íntrons são representados pelas linhas, totalizando 20 íntrons, por sua vez, os éxons são representados pelos retângulos pintados, totalizando 21 éxons, 4101 pb e 1366 aa.

Também analisamos as características topológicas previstas para a isoforma *EgNPC1L1-1*. O resultados referentes a estas análises são apresentados na figura 7.

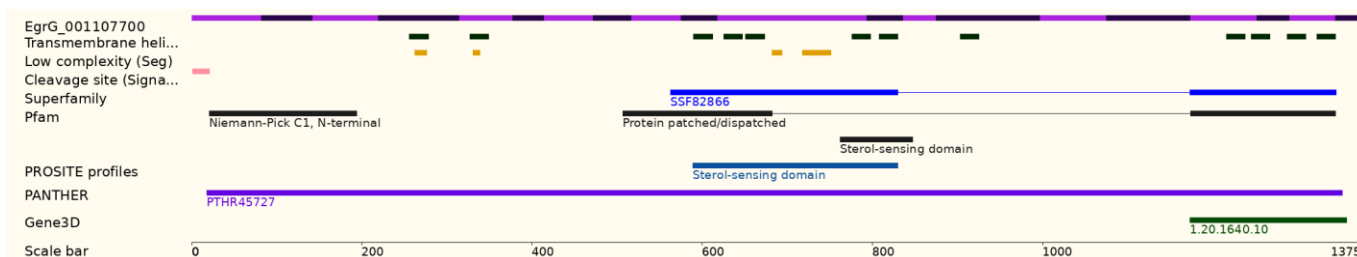


Figura 7: Ilustração das diferentes características topológicas identificadas para a isoforma EgNPC1L1-1. As diferentes cores indicam as características previstas pelos diferentes bancos de dados. As predições englobam (mas não se limitam) topologia, domínios e famílias.

De forma semelhante, a isoforma *EgNPC1L1-2* também possui domínios e famílias típicos (Figura8).

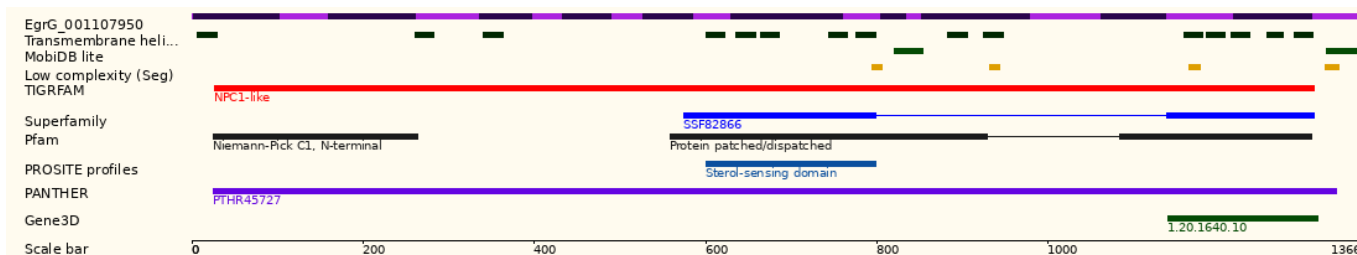


Figura 8: Ilustração das diferentes características topológicas identificadas para a isoforma EgNPC1L1-2. As diferentes cores indicam as características previstas pelos diferentes bancos de dados. As predições englobam (mas não se limitam) topologia, domínios e famílias.

5.2 Alinhamento do possível segmento da NPC1L1 que interage com a ezetimiba

O alinhamento das seqüências de aminoácidos das enzimas *EgNPC1L1-1* e *EgNPC1L1-2* com a seqüência de aminoácidos da enzima *hNPC1L1* no segmento destas proteínas correspondentes à região de

interação da ezetimiba com a hNPC1L1 (*loop C*, resíduos 265-629), mostra um grau de conservação de resíduos entre as espécies (**Figura 9**). Entre EgNPC1L1-1 e EgNPC1L1-2 foi verificado 38,7% de identidade e 26% de similaridade. As identidades/similaridades da EgNPC1L1-1 (28%/29,2%) e da EgNPC1L1-2 (30,3%/28,6%) com a hNPC1L1 também foram analisadas.

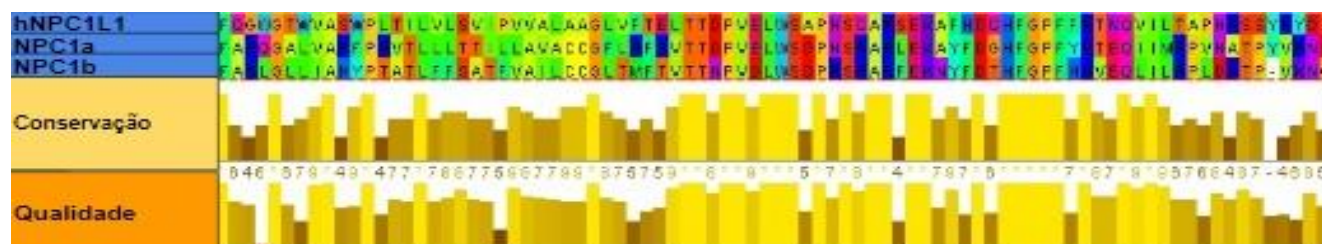


Figura 9: Alinhamento das sequências de aminoácidos dos segmentos das enzimas EgNPC1L1-1(Npc1a) e EgNPC1L1-2 (Npc1b) de *E. granulosus* com a hNPC1L1, correspondentes à predita como possível região de interação com a ezetimiba (*loop C*, resíduos 265-629). Na parte superior, as cores indicam a semelhança/identidade entre os aminoácidos; Na parte mediana é apresentado o grau de conservação dos resíduos de aminoácidos entre as enzimas; Na parte inferior é apresentada a qualidade do alinhamento baseada nos scores Blosum62.

5.3 Árvore filogenética das enzimas A árvore filogenética preliminar das enzimas EgNPC1L1-1 e EgNPC1L1-2 de *E. granulosus* e suas ortólogas de outros cestódeos, de mamíferos (*Homo sapiens* e *M. musculus*) e de *D. melanogaster*. As enzimas de espécies com maior proximidade filogenética foram agrupadas em clados próximos, porém com algumas posições inesperadas, de acordo com o gênero.

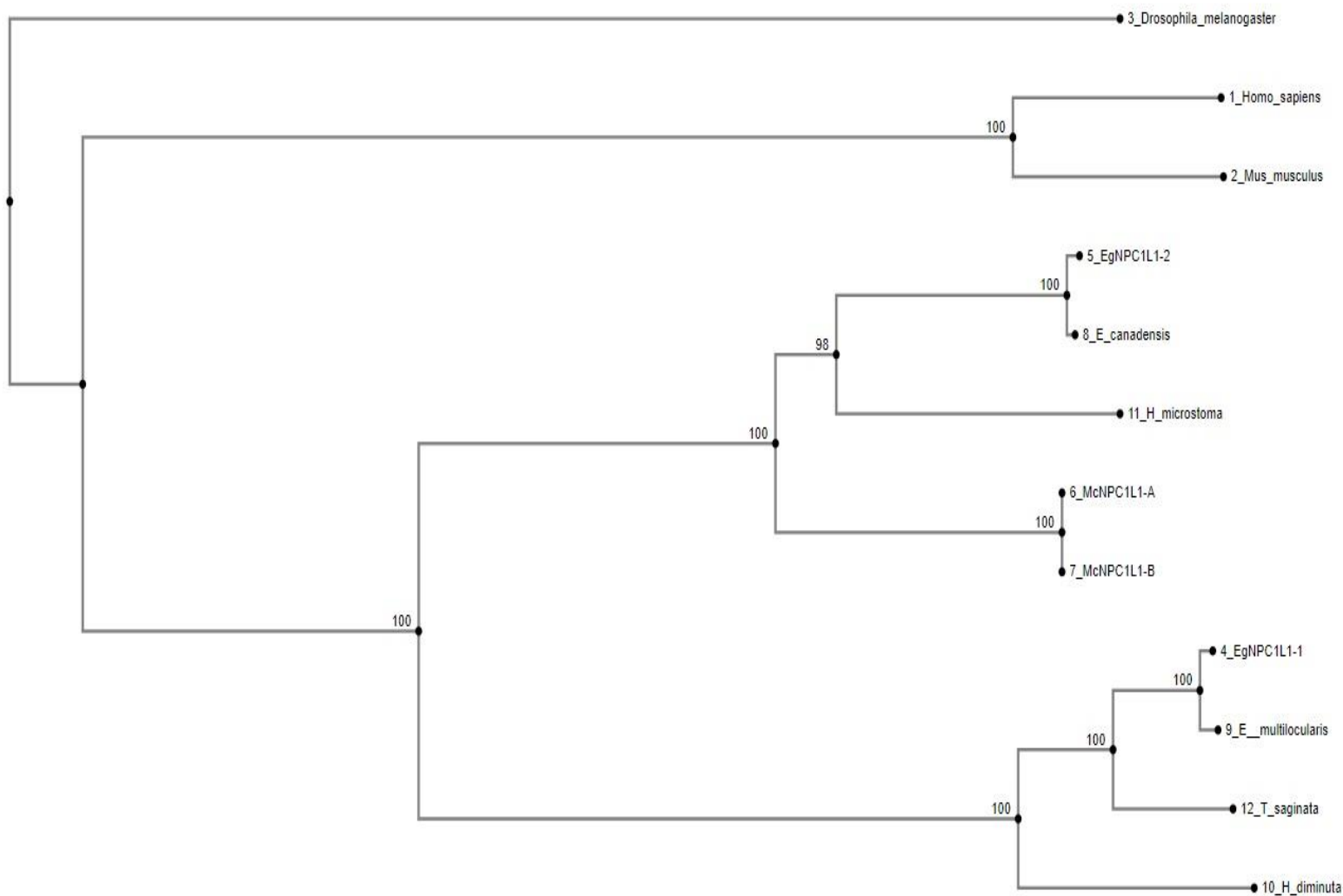


Figura 10: Arvore filogenética preliminar mostrando a conservação das seqüências analisadas. Para a construção da árvore, usou-se as seqüências de *D. melanogaster*, *H. sapiens*, *M. musculus*, *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. canadensis*, *T. saginata*, *H. diminuta*, *H. microstoma* e *M. corti*. O método Neighbor Joining foi utilizado Bootstrap = 1000.

6. DISCUSSÃO

Esse estudo visou verificar o potencial da enzima NPC1L1 como alvo para o reposicionamento de fármaco a ser utilizado no tratamento de infecções parasitárias causadas por cestódeos, e possivelmente outros helmintos. Foram recuperadas de bancos de dados informações sobre as enzimas de *M. corti* e *E. granulosus*, os organismos atualmente disponíveis para análise *in vitro* no laboratório, e esses dados foram usados em análises preliminares *in silico*, que indicaram a possibilidade do reposicionamento.

Primeiro, usando a sequência da enzima NPC1L1 humana como sonda, buscamos por possíveis NPC1L1's nos genomas de *M. corti* e *E. granulosus*. Então analisamos o tamanho médio (em pares de bases) e a composição de éxon e íntrons da sequências recuperadas. Comparando-se os tamanhos dos genes e suas estruturas em éxons e íntrons, observamos um tamanho médio do transcrito de cerca de 4300 pb (enquanto o transcrito que será traduzido na proteína canônica tem 5063 pb), e um número de éxons muito próximo ao da humana (20 éxons). Entre os parasitos, o número de éxons são bastante próximos. Toda essa informação coletada e analisada, indica uma certa conservação do gene entre as espécies analisadas e os humanos.

Também analisamos o tamanho das proteínas preditas pelos genes identificados. O tamanho das enzimas NPC1L1 de cestódeos que foram analisadas é bem próximo ao da enzima humana em número de resíduos de aminoácidos, com tamanho próximo a 1300 resíduos de aminoácidos (próximo a humana, de 1359 aa). Além disso, as enzimas dos cestódeos apresentam domínios característicos, os domínios N-terminal e o domínio sensível ao colesterol (WEINGLASS et al., 2008), além de outros domínios preditos e anotados em bancos de dados de famílias de proteínas. A partir disso se verifica a semelhança entre as proteínas NPC1L1 de *M. corti* e *E. granulosus* e a enzima humana, nos domínios presentes, as famílias da qual fazem parte e das posições dos domínios.

Para verificar mais a fundo a questão da conservação fizemos uma análise filogenética com as sequências recuperadas. A forma de agrupamento das sequências dos organismos dentro da árvore filogenética, a partir do alinhamento múltiplo entre as sequências das enzimas ortólogas e parálogas (no caso de *E. granulosus* e *M. corti*), foi como o esperado, com apenas uma exceção. A NPC1L1 de *D. melanogaster* foi colocada como grupo externo, *Mus musculus* e *Homo sapiens* foram agrupadas no mesmo clado, e as duas proteínas parálogas de *M. corti* também foram agrupadas juntas em outro clado, conforme esperado. Porém, em relação as demais espécies, era esperado que as proteínas de *Echinococcus* estivessem agrupadas formando um clado do gênero *Echinococcus*, devido a proximidade filogenética entre as espécies do mesmo gênero. O mesmo se esperava de espécies do gênero *Hymenolepis*. Embora não tenha ficado de acordo com o que

se esperava, as ortólogas de espécies do gênero *Echinococcus* tenderam a ficar agrupadas. A NPC1L1-1 de *E.granulosus* formou um clado com NPC1L1 de *E.candensis* e a NPC1L1-2 de *E.granulosus* formou um clado com *E.multilocularis*. Os agrupamentos não esperados na árvore podem ser possivelmente explicados devido a problemas nas anotações das proteínas preditas nos bancos de dados. As sequências de aminoácidos usadas na construção da árvore não tiveram sua anotação revisada manualmente no banco de dados do qual elas foram recuperadas (*WormBase Parasite*), podendo haver pequenos erros ou equívocos nas sequências recuperadas.

O alinhamento da região de interesse para interação com o fármaco ezetimiba, o loop-C, presente dentro no domínio N-terminal, mostra um certo grau de conservação e identidade entre os resíduos. As enzimas parálogas EgNPC1L1-1 e EgNPC1L1-2 apresentam 38,7% de identidade e 26% (38,7/26%) de similaridade entre elas. As identidades/similaridades da EgNPC1L1-1 (28%/29,2%) e da EgNPC1L1-2 (30,3%/28,6%) com a hNPC1L1, o que indica que seria possível a interação entre o fármaco e as enzimas dos parasitos. Os graus de identidade/similaridade entre as enzimas de *E. granulosus* e a ortóloga humana ajudam a suportar a hipótese de que a ezetimiba poderia ser utilizada como um inibidor eficiente para as enzimas do parasito.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo obteve resultados preliminares que indicam a conservação da enzima NPC1L1 de cestódeos quando comparada a enzima humana. Não foram realizados ensaios que nos mostrassem melhor a interação entre o fármaco e a enzima dos parasitos, tanto *in vitro*, quanto *in silico*. Dessa forma, ainda são necessárias mais análises *in silico*, como modelagem das proteínas e ensaios de docking virtual, e ensaios *in vitro* utilizando parasitos vivos em exposição à ezetimiba.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-NETO, Valter Viana; CUNHA-JÚNIOR, Edézio Ferreira; DO CANTO-CAVALHEIRO, Marilene Marcuzzo; ATELLA, Geórgia Correa; DE ALMEIDA FERNANDES, Talita; COSTA, Paulo Roberto Ribeiro; TORRES-SANTOS, Eduardo Caio. **Antileishmanial activity of ezetimibe: Inhibition of sterol biosynthesis, in vitro synergy with azoles, and efficacy in experimental cutaneous leishmaniasis.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [S. l.], v. 60, n. 11, p. 6844–6852, 2016. DOI: 10.1128/AAC.01545-16.

CAMARGO DE LIMA, Jeferson; MONTEIRO, Karina Mariante; BASIKA CABRERA, Tatiana Noel; PALUDO, Gabriela Prado; MOURA, Hercules; BARR, John R.; ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique Bunselmeyer. **Comparative proteomics of the larval and adult stages of the model cestode parasite *Mesocestoides corti*.** *Journal of Proteomics*, [S. l.], v. 175, p. 127–135, 2018. DOI: 10.1016/j.jprot.2017.12.022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.12.022>.

COLLINS, James J. **Platyhelminthes.** *Current Biology*, [S. l.], v. 27, n. 7, p. R252–R256, 2017. DOI: 10.1016/j.cub.2017.02.016.

DIAS, Luiz C.; DESSOY, Marco A.; GUIDO, Rafael V. C.; OLIVA, Glaucius; ANDRICOPULO, Adriano D. **Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades.** *Química Nova*, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 1552–1556, 2013. DOI: 10.1590/S0100-40422013001000011.

HIGUITA, Nelson Iván Agudelo; BRUNETTI, Enrico; MCCLOSKEY, Cindy. **Cystic Echinococcosis.** *Journal of Clinical Microbiology*, [S. l.], v. 54, n. 3, p. 518–523, 2016. DOI: 10.1128/JCM.02420-15.

HOFFMANN, Adriane Nunes; MALGOR, Ramiro; RUE, Mário Luiz de La. **Prevalência de *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) em cães urbanos errantes do município de Dom Pedrito (RS), Brasil.** *Ciência Rural*, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 843–847, 2001. DOI: 10.1590/s0103-84782001000500017.

KERN, P.; MENEZES DA SILVA, A.; AKHAN, O.; MÜLLHAUPT, B.; VIZCAYCHIPI, K. A.; BUDKE, C.; VUITTON, D. A. **The Echinococcoses: Diagnosis, Clinical Management and Burden of Disease.** *Advances in Parasitology*, [S. l.], v. 96, p. 259–361, 2017. DOI: 10.1016/bs.apar.2016.09.006.

KLUG, Dana M.; GELB, Michael H.; POLLASTRI, Michael P. **Repurposing strategies for tropical disease drug discovery**. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, [S. l.], v. 26, n. 11, p. 2569–2576, 2016. DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.03.103. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.103>.

KOSOGLOU, Teddy; STATKEVICH, Paul; JOHNSON-LEVONAS, Amy O.; PAOLINI, John F.; BERGMAN, Arthur J.; ALTON, Kevin B. **Ezetimibe: A review of its metabolism, pharmacokinetics and drug interactions**. *Clinical Pharmacokinetics*, [S. l.], v. 44, n. 5, p. 467–494, 2005. DOI: 10.2165/00003088-200544050-00002.

KOZIOL, Uriel. **Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes**. *Experimental Parasitology*, [S. l.], v. 180, p. 84–100, 2017. DOI: 10.1016/j.exppara.2016.12.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2016.12.004>.

MARKOSKI, Melissa M.; BIZARRO, Cristiano V.; FARIAS, Sandra; ESPINOZA, Ingrid; GALANTI, Norbel; ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique B. **In vitro segmentation induction of Mesocestoides corti (cestoda) tetrathyridia**. *Journal of Parasitology*, [S. l.], v. 89, n. 1, p. 27–34, 2003. DOI: 10.1645/0022-3395(2003)089[0027:IVSIOM]2.0.CO;2.

MIHMANLI, Memmet; IDIZ, Ufuk Oguz; KAYA, Cemal; DEMIR, Uygur; BOSTANCI, Ozgur; OMEROGU, Sinan; BOZKURT, Emre. **Current status of diagnosis and treatment of hepatic echinococcosis**. *World Journal of Hepatology*, [S. l.], v. 8, n. 28, p. 1169–1181, 2016. DOI: 10.4254/wjh.v8.i28.1169.

MONTEIRO, Karina M.; DE CARVALHO, Marcos O.; ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique B. **Proteomic analysis of the Echinococcus granulosus metacestode during infection of its intermediate host**. *Proteomics*, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 1985–1999, 2010. DOI: 10.1002/pmic.200900506.

OLSON, Peter D.; LITTLEWOOD, D. Timothy J.; BRAY, Rodney A.; MARIAUX, Jean. **Interrelationships and Evolution of the Tapeworms (Platyhelminthes : Cestoda)**. [S. l.], n. 1998, 2001. DOI: 10.1006/mpev.2001.0930.

PAVLETIC, Carlos F. et al. **Cystic echinococcosis in South America: a call for action**. *Revista Panamericana de Salud Pública*, [S. l.], v. 41, p. 1, 2017. DOI: 10.26633/rpsp.2017.42.

ROJO-ARREOLA, Liliana; LONG, Thavy; ASARNOW, Dan; SUZUKI, Brian M.; SINGH, Rahul; CAFFREY, Conor R. **Chemical and genetic validation of the statin drug target to treat the helminth disease, schistosomiasis.** PLoS ONE, [S. l.], v. 9, n. 1, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0087594.

ROMIG, T.; DEPLAZES, P.; JENKINS, D.; GIRAUDOUX, P.; MASSOLO, A.; CRAIG, P. S.; WASSERMANN, M.; TAKAHASHI, K.; DE LA RUE, M. **Ecology and Life Cycle Patterns of Echinococcus Species.** [s.l.] : Elsevier Ltd, 2017. v. 95 DOI: 10.1016/bs.apar.2016.11.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apar.2016.11.002>.

SILES-LUCAS, Mar; CASULLI, Adriano; CIRILLI, Roberto; CARMENA, David. **Progress in the pharmacological treatment of human cystic and alveolar echinococcosis: Compounds and therapeutic targets.** [s.l.: s.n.]. v. 12 DOI: 10.1371/journal.pntd.0006422.

THOMPSON, R. C. A. **Biology and Systematics of Echinococcus.** [s.l.] : Elsevier Ltd, 2017. v. 95 DOI: 10.1016/bs.apar.2016.07.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apar.2016.07.001>.

TSAI, Isheng J. et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. **Nature**, [S. l.], v. 496, n. 7443, p. 57–63, 2013. DOI: 10.1038/nature12031.

WEBB, Camille; CABADA, Miguel M. **Intestinal cestodes.** **Current Opinion in Infectious Diseases**, [S. l.], v. 30, n. 5, p. 504–510, 2017. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000400.

WEINGLASS, Adam B. et al. **Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [S. l.], v. 105, n. 32, p. 11140–11145, 2008. DOI: 10.1073/pnas.0800936105.

ZAROWIECKI, Magdalena; BERRIMAN, Matt. **What helminth genomes have taught us about parasite evolution.** Parasitology, [S. l.], v. 142, p. S85–S97, 2015. DOI: 10.1017/S0031182014001449.

ZHENG, Huajun et al. **The genome of the hydatid tapeworm Echinococcus granulosus.** Nature Genetics, [S. l.], v. 45, n. 10, p. 1168–1175, 2013. DOI: 10.1038/ng.2757.

World Health Organization. **Control of Neglected Tropical Diseases**. Disponível em:

<[h https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/overview.](https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/overview)> Acesso em: 8 ago. 2021

SIZAR O, NASSEREDDIN A, Talati R. **Ezetimibe**. [Updated 2021 Jun 11]. In: StatPearls [Internet].

Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532879/>> Acesso em 13 out. 2021