



Caracterização funcional da proteína ribonucleotídeo-redutase de *Echinococcus granulosus* visando a identificação de novos alvos para o controle da echinococcose cística

Viviane Noll Louzada Flores¹, Henrique Bunselmeyer Ferreira²

¹ Graduanda em Biotecnologia - UFRGS

² Orientador- Centro de Biotecnologia, Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional

INTRODUÇÃO

Echinococcus granulosus é um platelminto parasita pertencente à classe Cestoda que é o responsável pela doença denominada echinococcose cística, considerada um persistente problema de saúde pública e veterinária nos 5 continentes (1) incluindo a região sul do Brasil. Essa parasitose é causada pela ingestão acidental dos ovos desse platelminto. O hospedeiro intermediário (ovelha) ou o acidental (homem) se contamina ao ingerir os ovos liberados no ambiente pelo cão (hospedeiro definitivo). Os ovos se rompem no intestino e liberam a larva, que perfura a mucosa e atinge a circulação sanguínea, chegando ao fígado. O ciclo no homem termina com a formação do cisto hidático no fígado e/ou pulmão e não há eliminação de formas de contágio (2) (Fig. 1)

Entretanto, graças ao sequenciamento genômico de *E. granulosus* s.s. foi possível a identificação de diversos genes codificadores de proteínas que são potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas afim de controlar essa parasitose. Entre essas proteínas-alvo, encontra-se a enzima ribonucleotídeo-redutase (RNR), cuja função está relacionada à síntese de desoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeos (3).

A importância da RNR como alvo para o controle parasitário deve-se a seu possível envolvimento em processos celulares vitais, como a replicação, e a divisão celular, tornando-se um atrativo alvo para promover a morte celular programada (apoptose), seja através da inibição do reparo do DNA, ou impedindo a proliferação celular.

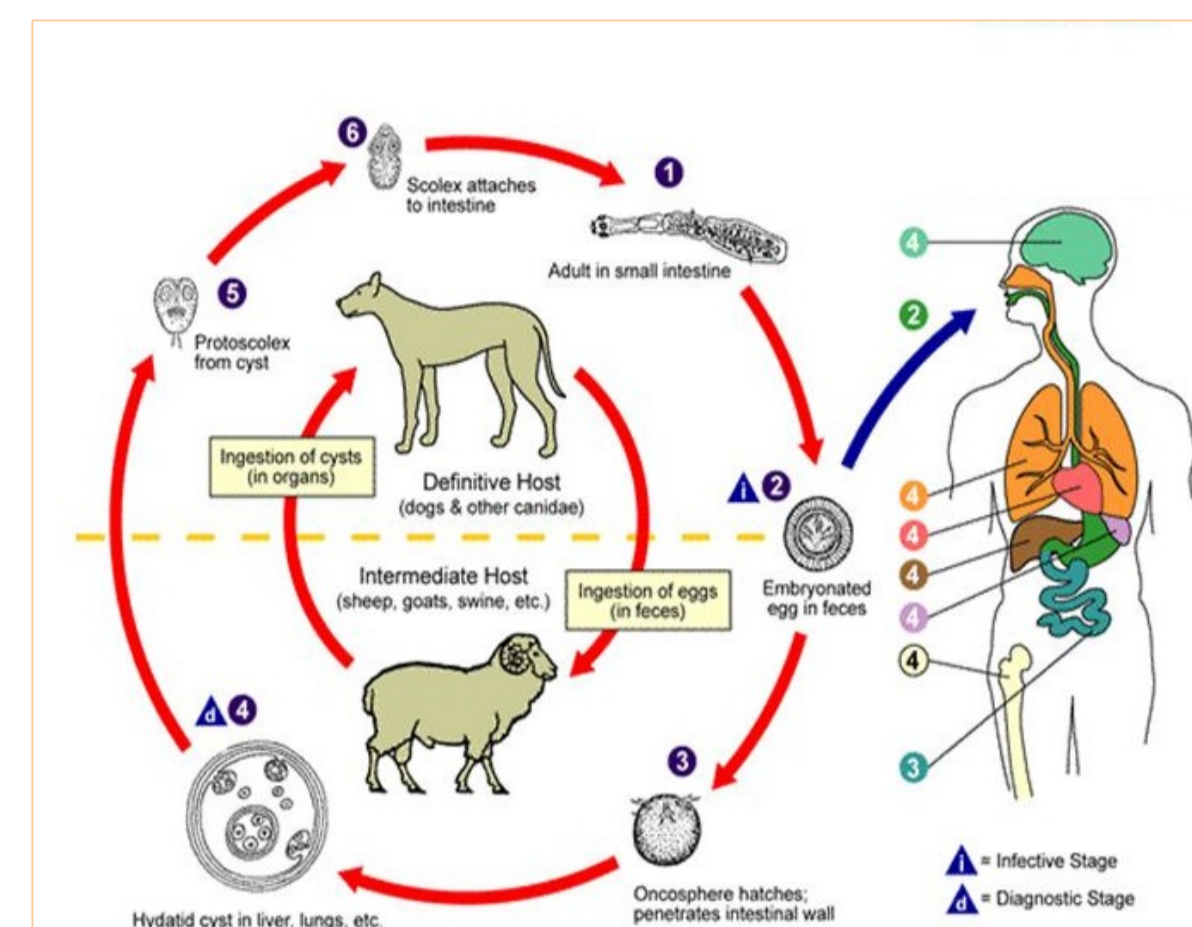


Fig. 1: Ciclo de vida do organismo *Echinococcus granulosus*.

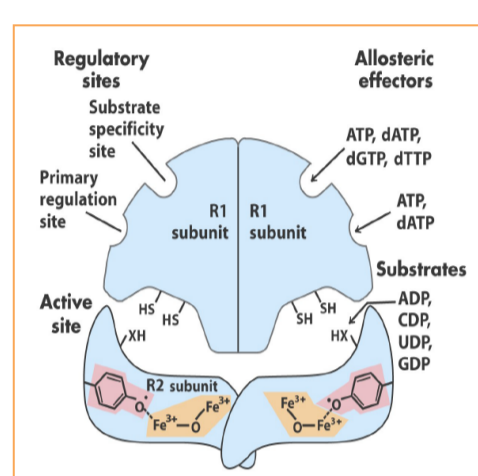
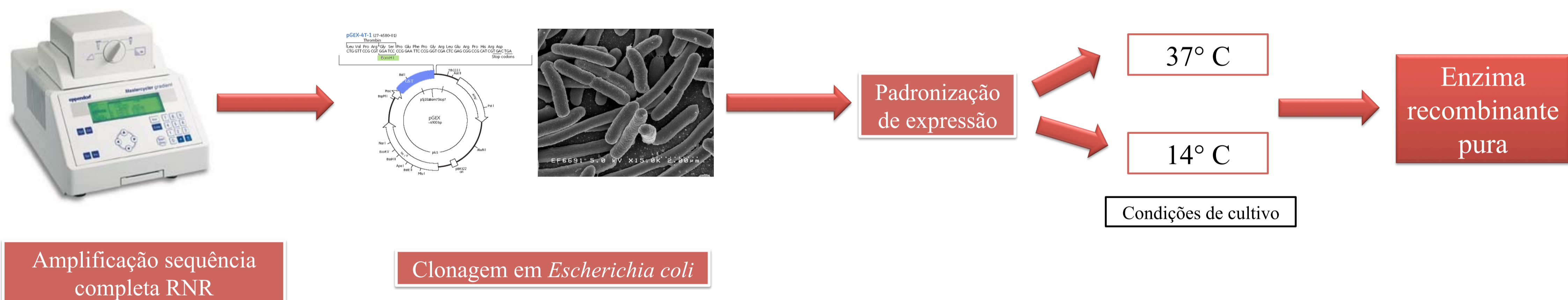


Fig. 2: Estrutura da proteína Ribonucleotídeo-redutase (RNR).

OBJETIVO

Caracterização funcional da ribonucleotídeo-redutase de *Echinococcus granulosus* a partir da análise de fenótipos de perda de função proporcionados pelo seu silenciamento pela técnica de interferência de RNA (RNAi).

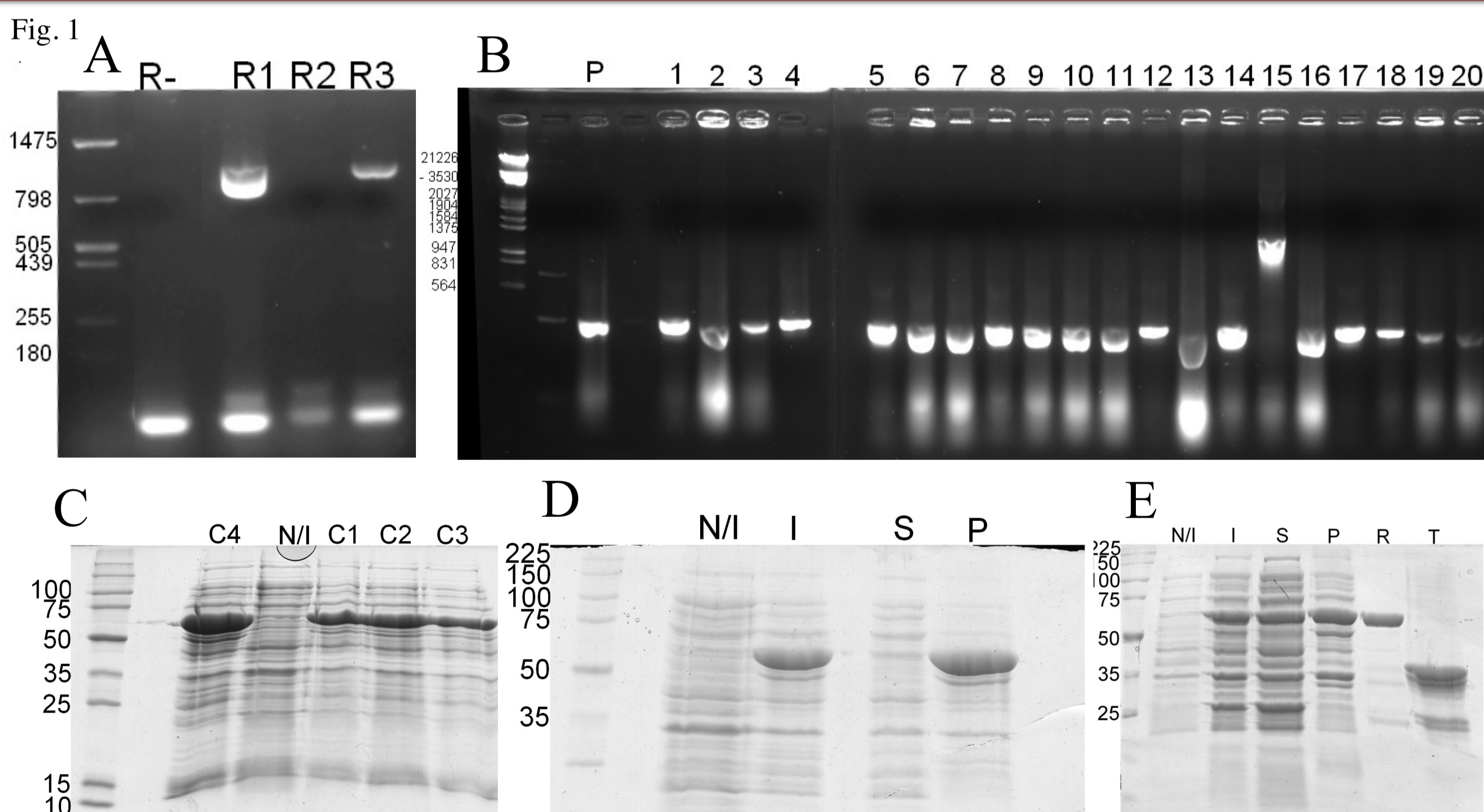
MATERIAIS E MÉTODOS



RESULTADOS

Foi feita a amplificação da seqüência codificadora completa da ribonucleotídeo-redutase de *E. granulosus* s.s. (1005 pb) (Fig 1A). A seqüência obtida foi clonada no vetor plasmidial de expressão pGEX-TEV por recombinação *in vivo* em *Escherichia coli* (Fig 1B). Foi realizada a padronização da expressão da ribonucleotídeo-redutase recombinante em diferentes condições de cultivo (Fig 1C), obtendo-se a proteína solúvel com a indução a temperatura de 14°C (Fig. 1D). A purificação por cromatografia de afinidade glutationa-sefarose permitiu obter a enzima recombinante com alto grau de pureza (Fig. E).

Fig. 1: **A:** PCR para amplificação da seqüência codificadora completa da ribonucleotídeo-redutase de *Echinococcus granulosus*; **B:** PCR de colônias para identificar os clones recombinantes pGEX-RNR (colônia 15); **C:** Análise por SDS-PAGE da indução da ribonucleotídeo-redutase a 37°C durante 3 horas. Foi utilizada a cepa de *E. coli* pLysE, e a indução foi feita com 0,1mM de IPTG. N/I: Pellet de bactérias não induzidas. C1-C4: Teste de indução utilizando diferentes clones recombinantes; **D:** Teste de solubilidade da ribonucleotídeo-redutase induzida a 37°C. Foi utilizado o clone 4 e a concentração de IPTG é 0,1mM. N/I: Pellet de *E. coli* pLysE não induzido com IPTG. I: Pellet bacteriano induzido com IPTG. S: Sobrenadante após sonicação. P: Pellet bacteriano após sonicação.; **E:** Análise por SDS-PAGE das etapas da purificação da ribonucleotídeo-redutase de *Echinococcus granulosus*. N/I: Pellet *E. coli* sem indução. I: Pellet de *E. coli* induzido com IPTG. Sobrenadante (S) e pellet (P) após sonicação. R: RNR fusionada à GST. T: RNR após clivagem com a endopeptidase de Tobacco Etch Virus (TEV).



CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

- A seqüência codificadora completa de uma ribonucleotídeo-redutase de *E. Granulosus* foi clonada no vetor pGEX-TEV;
- A enzima recombinante (38-kDa) foi produzida em sistemas de expressão heterólogos (*E. coli*) com alto rendimento e pureza;
- Essa proteína será utilizada na imunização de coelhos para produção de anticorpos específicos. Tais anticorpos serão utilizados para avaliação do nível de expressão da ribonucleotídeo-redutase em protoescolícos submetidos ou não a transfecção com RNAi.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McManus, D. P., W. Zhang, et al. (2003). "Echinococcosis." *Lancet* 362(9392): 1295-304.
2. Thompson, R. C. (1995). "Biology and Systematics of Echinococcus." In: *Echinococcus and Hydatid Disease*. CAB International, Wallingford p1-50.
3. Tsai, I. et al. (2013). "The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism". *Nature* 496:57-63.