



# Universidade: presente!



21.25. OUTUBRO • CAMPUS DO VALE

## XXXI SIC

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

Marcelo Pasa Panesso; Henrique Bunselmeyer Ferreira (orientador)\* Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional e Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### Introdução

As espécies do complexo *Echinococcus granulosus* sensu lato (s.l.) apresentam ciclos vitais complexos envolvendo dois hospedeiros mamíferos (Figura 1). As formas larvais (metacéstódeos ou cistos hidáticos), são as causadoras da equinococose cística em seres humanos e ungulados domésticos. Esta doença é uma zoonose crônica de distribuição mundial e endêmica no Cone sul da América do Sul (1). Os tratamentos quimioterápicos atuais são pouco eficazes e se fazem necessários novos anti-helmínticos e novas abordagens terapêuticas. Análises dos genomas de algumas espécies do gênero *Echinococcus* permitiram a identificação de alguns alvos promissores para o desenvolvimento de fármacos (2) e, entre eles, estão enzimas envolvidas na síntese de nucleotídeos, incluindo a ribonucleotídeo-redutase (RNR). Esta enzima tetramérica, composta por duas subunidades RNR1 e duas subunidades RNR2 (Figura 2), participa da rota de síntese de desoxirribonucleotídeos, sendo, por isso, de grande importância para processos celulares que envolvem síntese de DNA, como os de replicação e de reparo.

#### Objetivo

O objetivo geral deste estudo é a identificação dos componentes da via de síntese de nucleotídeos de *E. granulosus* e avaliar o potencial anti-helmíntico de inibidores de enzimas dessa via. Os objetivos específicos da etapa atual do projeto, são a identificação *in silico* das enzimas da via de salvação de nucleotídeos codificadas pelo genoma de *E. granulosus* s.s.; a análise da suscetibilidade de protoescólices de *E. granulosus* a inibidores da síntese de nucleotídeos e a avaliação da expressão em nível transcricional dos genes codificadores das enzimas da via de salvação de nucleotídeos em protoescólices de *E. granulosus* e de possíveis alterações em resposta ao tratamento com drogas inibidoras da síntese de nucleotídeos.

#### Materiais e métodos

##### Identificação dos componentes da via

As sequências de aminoácidos de enzimas humanas da via de salvação de purinas e pirimidinas foram utilizadas como *query* no algoritmo BLAST para a identificação de ortólogos no genoma de *E. granulosus* s.s. .

##### Suscetibilidade de protoescólices a inibidores da síntese de nucleotídeos

Protoescólices (pré-adultos) de duas espécies do complexo *Echinococcus granulosus* s.l. (*E. granulosus* s.s. e *Echinococcus ortleppi*) foram cultivados na presença ou ausência dos inibidores de RNR hidroxiureia (HU) (3), e COH29 (4). O cultivo foi realizado com as concentrações de 0, 5 mM, 15 mM e 50 mM de HU, por 48 h, e de 0, 0,25 μM, 0,5 μM e 1mM de COH29, por 72 h.

##### Análise transcricional de genes da via de salvação em resposta a tratamento com hidroxiureia

Para avaliar um possível efeito compensatório em resposta a inibição da síntese de nucleotídeos foi analisada a expressão dos genes codificadores de alguns componentes da via de salvação em protoescólices após o tratamento com HU.

Protoescólices foram cultivados na presença ou ausência de hidroxiureia 0, 5 mM, 15 mM e 50 mM de HU, por 48 h e foi analisada a expressão dos genes codificadores de hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase e nucleosídeo-difosfato-quinase, UMP-CMP-quinase e CTP-sintase por RT-qPCR utilizando GAPDH como controle constitutivo.

#### Resultados

Foram identificados os componentes da via de salvação de nucleotídeos de *E. granulosus* (Figura 3 e 4). Os componentes identificados indicam a capacidade do parasito de utilizar bases nitrogenadas livres e nucleosídeos para síntese de nucleotídeos. Foi também observada a ausência de enzimas envolvidas no catabolismo e na interconversão de purinas. Algumas das enzimas identificadas podem ser posteriormente avaliadas como potenciais alvos.

Foi observada a perda de viabilidade de protoescólices após o tratamento com inibidores de RNR (Figura 5 e 6). Foram observadas mudanças morfológicas nos protoescólices e a presença de indivíduos mortos após o tratamento, também foi observado que protoescólices de *E. ortleppi* foram mais resistentes ao tratamento do que protoescólices de *E. granulosus* s. s.. Esses resultados indicam o potencial anti-helmíntico de inibidores de RNR, no entanto são necessários mais testes para confirmar que a perda de viabilidade se deve à inibição da RNR.

Foi realizada uma análise preliminar da expressão dos genes da via de salvação em resposta ao tratamento com hidroxiureia, aparentemente sendo observada uma alteração em resposta ao tratamento (Figura 7), no entanto são necessárias réplicas do experimento para confirmar os resultados obtidos. O controle constitutivo utilizado apresentou diferenças na sua expressão de forma que foi iniciada a escolha de outro controle constitutivo mais adequado, também foram obtidas mais amostras para a realização de réplicas do experimento.

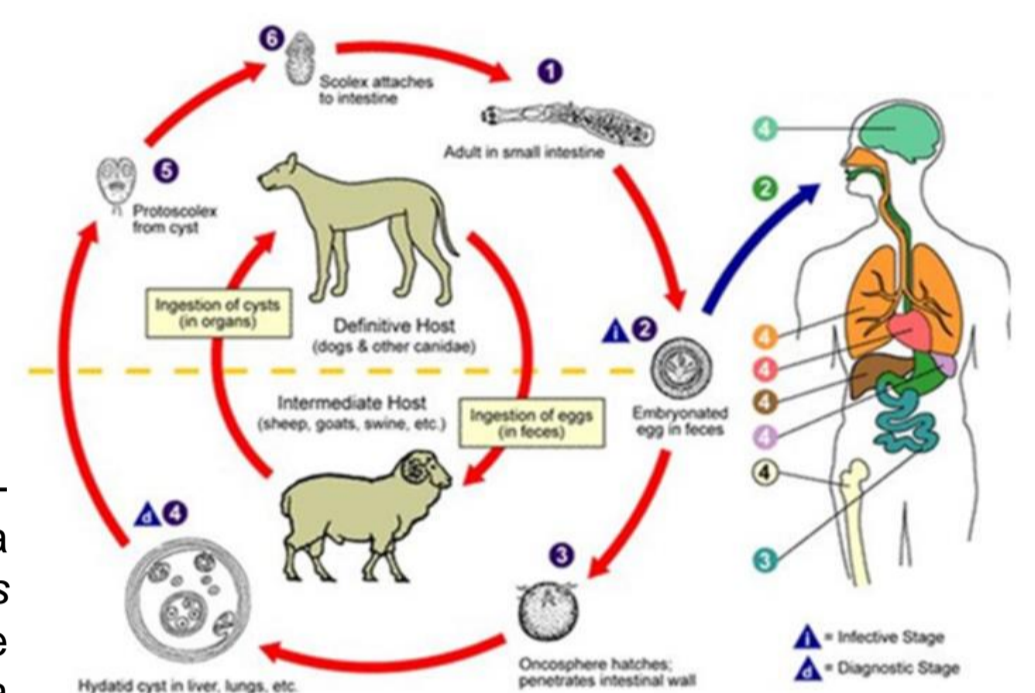


Figura 1: ciclo de vida de *E. granulosus* s.l.

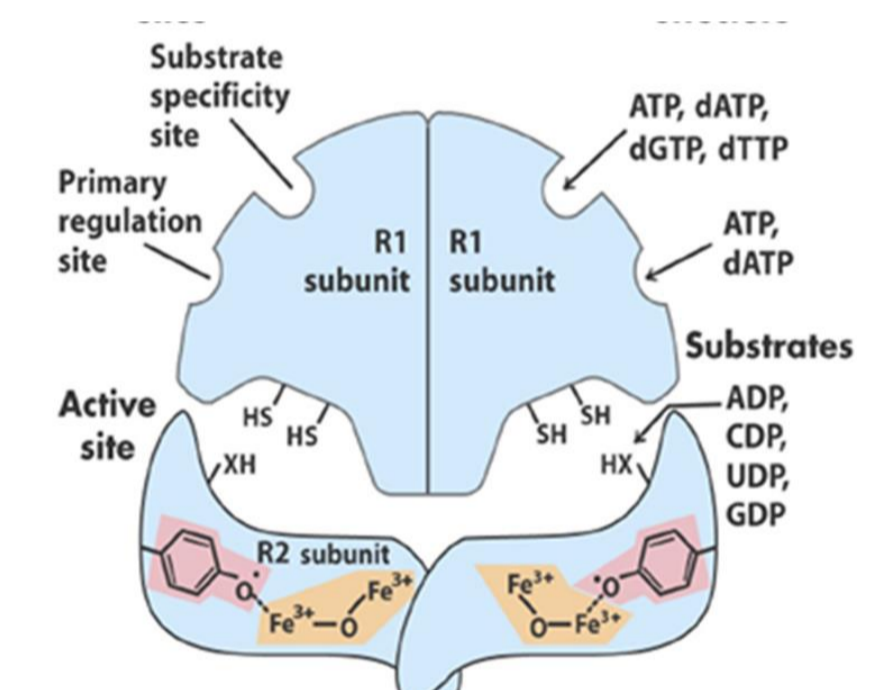


Figura 2: Estrutura da RNR

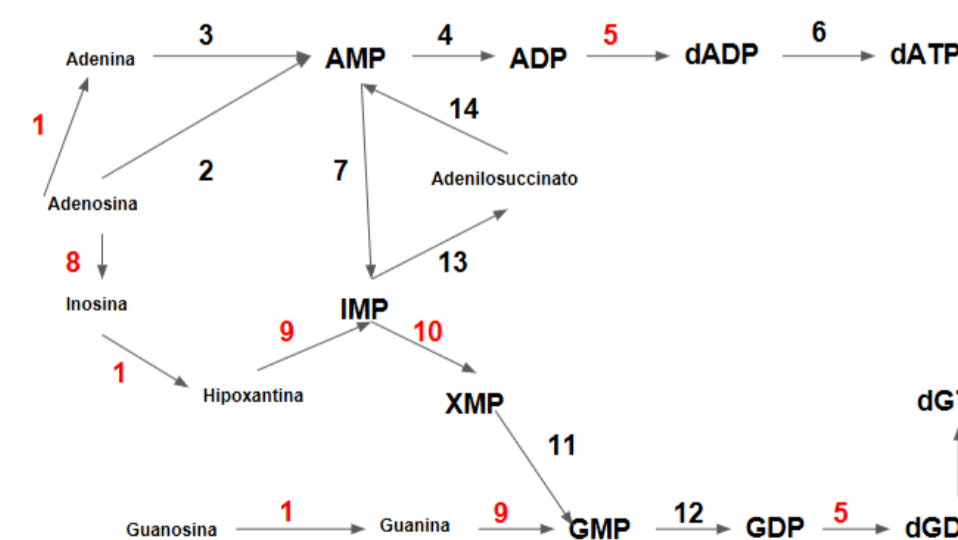


Figura 3: Via de salvação de purinas proposta para *E. granulosus* s. s. 1) nucleosídeo-fosforilase; 2) adenosina-quinase; 3) adenosina-fosforribosiltransferase; 4) adenilato-quinase; 5) ribonucleotídeo-redutase; 6) nucleosídeo-difosfato-quinase; 7) AMP-desaminase; 8) adenosina-desaminase; 9) hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase; 10) IMP-desidrogenase; 11) GMP-sintase; 12) guanilato-quinase; 13) adenilossuccinato-liase; 14) adenilossuccinato-liase

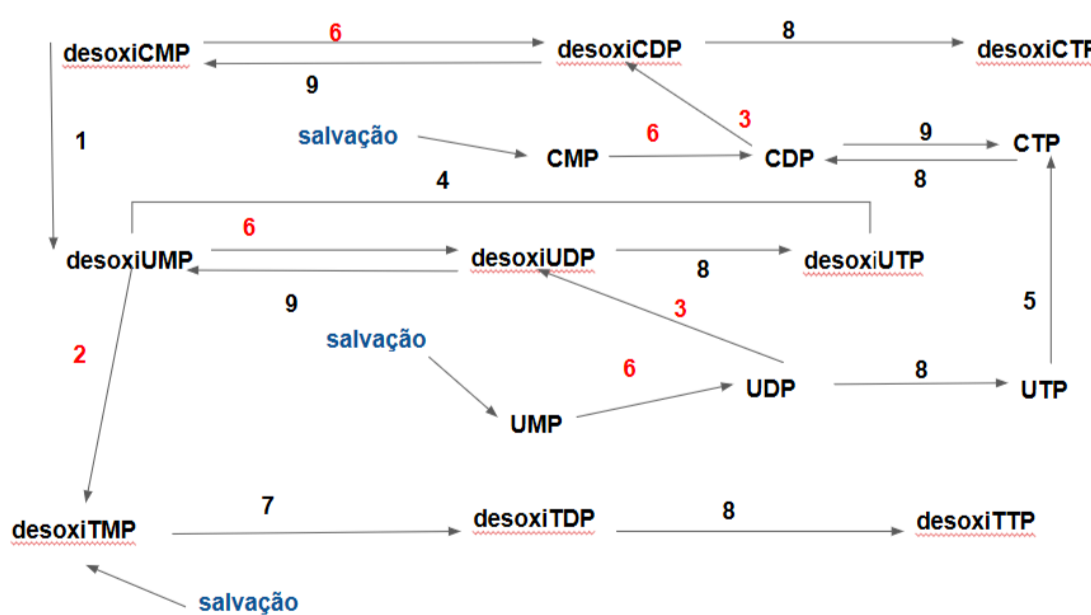


Figura 4: Via de salvação de pirimidinas proposta para *E. granulosus* s. s. 1) desoxiCMP-desaminase; 2) timidilato-sintase; 3) ribonucleotídeo-redutase; 4) desoxiuridina-trifosfato-hidrolase; 5) CTP-sintase; 6) UMP-CMP-quinase; 7) TMP-quinase; 8) nucleosídeo-difosfato-quinase; 9) fosfatase não específica. Em vermelho estão indicadas enzimas para as quais já existem inibidores comerciais; em azul está indicando onde a via de salvação insere os nucleotídeos produzidos.

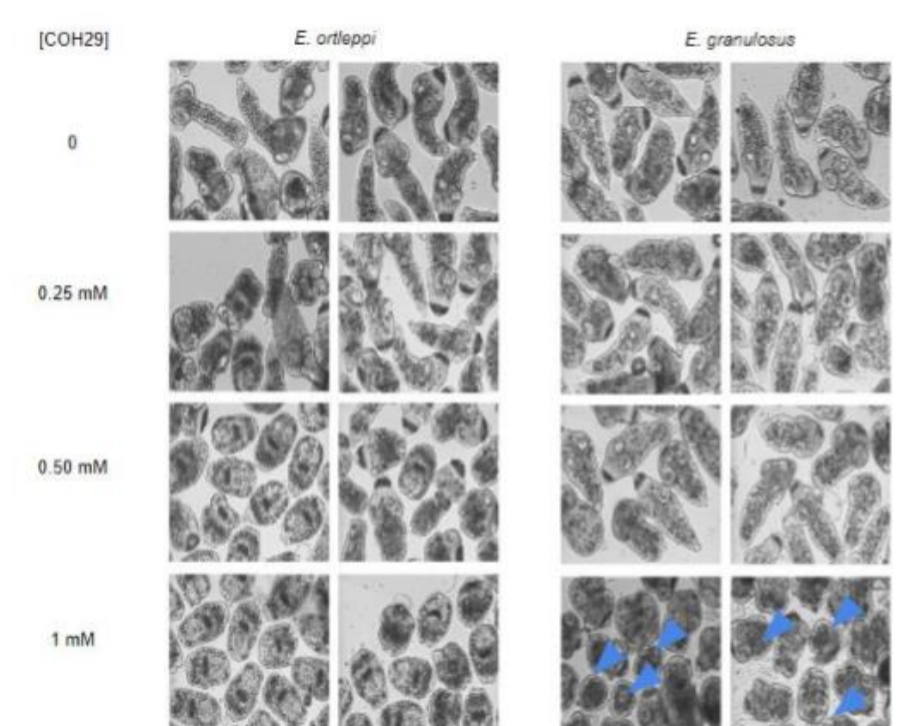


Figura 5: Efeito de COH29 em protoescólices de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*. As setas azuis indicam protoescólices mortos em resposta ao tratamento.

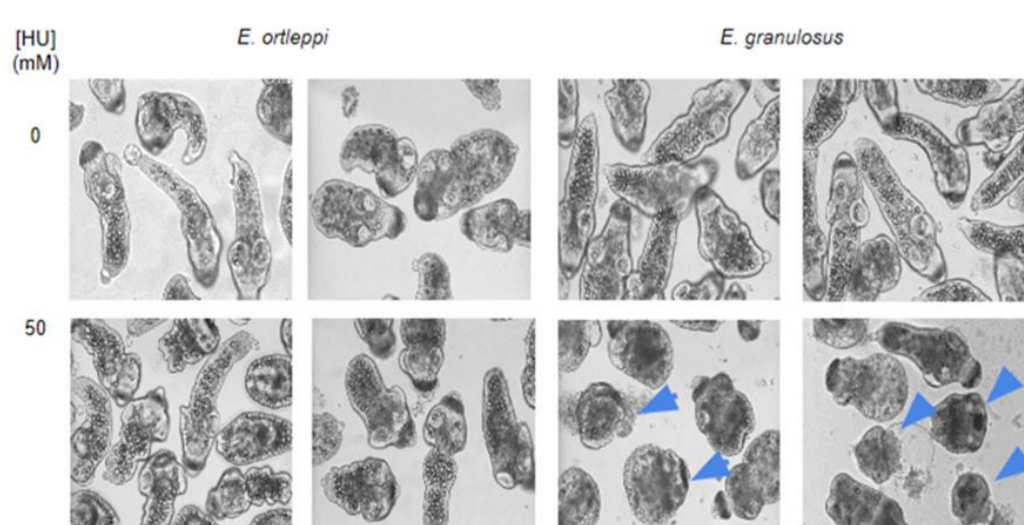
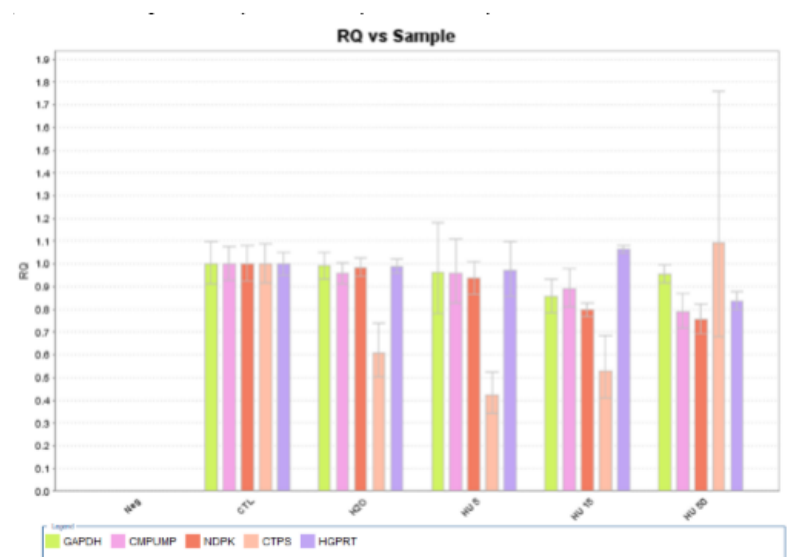


Figura 6: Efeito de HU em protoescólices de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* após 24 h. Setas azuis indicam protoescólices mortos em resposta ao tratamento

Figura 7: Análise dos genes da via de salvação por qPCR. GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; CMPUMP: UMP-CMP-quinase; NDPK: nucleosídeo-difosfato-quinase; CTPS: CTP-sintase; HGPRT: hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase.



#### Referências bibliográficas

- (1) Deplazes, et al (2017). "Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis." Adv Parasitol 95: 315-493.
- (2) Tsai et al (2013). "The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism." Nature 496(7443): 57-63
- (3) Chen et al (2015) "The Novel Ribonucleotide Reductase Inhibitor COH29 Inhibits DNA Repair In Vitro" Mol Pharmacol 87: 996-1005
- (4) Singh et al (2016) "The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea" Gene 7(11):99