



Modelagem estrutural da enzima Niemann-Pick C1 de *Echinococcus granulosus* e ensaios de docking com a ezetimiba

Autor: Thom Pedroso Nunes Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira

* O trabalho também teve a participação do doutorando Jeferson Camargo de Lima.

Introdução

A equinococose cística é uma infecção causada pelo estágio larval de parasitos do gênero *Echinococcus* (classe Cestoda; família Taeniidae) [1]. A doença apresenta distribuição cosmopolita, sendo um grande problema de saúde pública e veterinária em muitos países. Ela é endêmica no Cone Sul da América do Sul, incluindo a região sul do Brasil. A equinococose está no grupo das doenças tropicais negligenciadas, segundo a Organização Mundial da Saúde (https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/). O tratamento para equinococose se limita ao cirúrgico ou o quimioterápico, como uso de benzimidazólicos, ambos apresentando baixa eficiência. Tanto para a equinococose como para outras helmintíases, faz-se necessário investimento no desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos [2].

Organismos do gênero *Echinococcus*, assim como outros cestódeos, absorvem nutrientes do hospedeiro pelo tegumento, incluindo colesterol, o qual não pode ser sintetizado *de novo* pelos parasitos. Em *Echinococcus granulosus* e outros cestódeos a via de síntese do colesterol é deficiente, mas ainda vital para o parasito, pois é necessária para prenilação de proteínas por exemplo [3]. Em cestódeos, dentro dessa via, a enzima Niemann-Pick C1 (NPC1, com duas isoformas, NPC1a e NPC1b), ortóloga à enzima NPC1L1 humana, reconhecida como alvo do fármaco inibidor ezetimiba, usado no tratamento de hipercolesterolemia. A similaridade entre a enzima humana e as ortólogas de *Echinococcus* spp. e outras espécies de cestódeos justifica estudos no sentido de validar o uso da ezetimiba como potencial anti-helmíntico. O presente projeto está sendo desenvolvido para avaliação *in silico* da interação das enzimas NPC1a e NPC1b de *E. granulosus* com a ezetimiba

Materiais & Métodos

As sequências gênicas e de aminoácidos correspondentes às enzimas NPC1a e NPC1b de *E. granulosus*, *Echinococcus canadensis*, *Echinococcus multilocularis* e de outros cestódeos (*Taenia saginata*, *Hymenolepis diminuta*, *Hymenolepis microstoma* e *Mesocestoides corti*) foram recuperadas do banco de dados WormBase Parasite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>). As sequências de aminoácidos das enzimas ortólogas humana (hNPC1L1), de *Mus musculus* (mNPC1L1) e de *Drosophila melanogaster* (dNPC1L1) foram recuperadas do banco de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>). A ferramenta MAFFT 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) foi utilizada para alinhamento das sequências proteicas e construção de uma árvore filogenética. Posteriormente, as ferramentas SWISS-MODEL e MODELLER serão utilizadas para propor modelos estruturais tridimensionais das enzimas NPC1a e NPC1b de *E. granulosus*. Com base nestes modelos serão feitas análises *in silico* de docking com a estrutura da ezetimiba, utilizando a ferramenta DockThor.

Resultados & Discussão



Figura 1. Estrutura dos genes codificadores da NPC1a (A) e da NPC1b (B) de *E. granulosus*. Dados recuperados da base de dados WormBase Parasite. Éxons (retângulos) e íntrons (linhas) são mostrados.

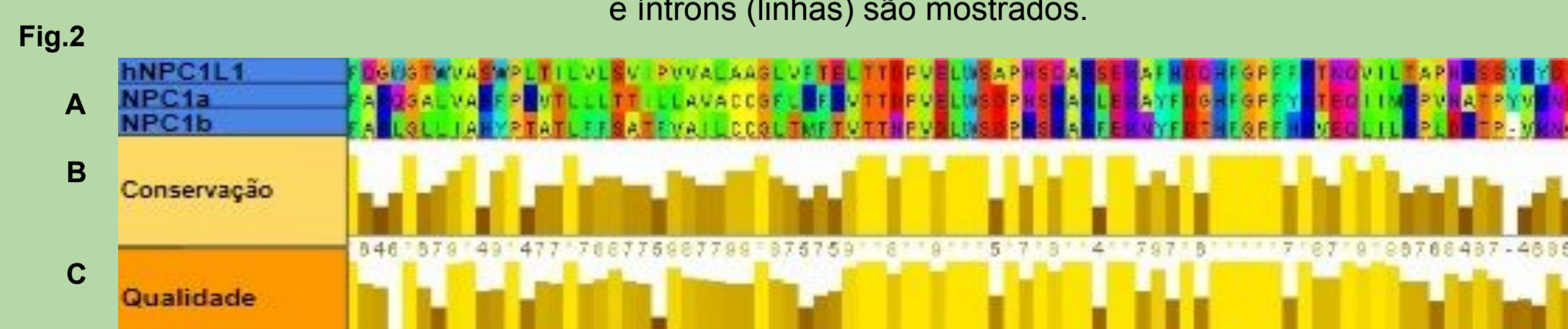


Figura 2. Alinhamento das sequências de aminoácidos dos segmentos das enzimas NPC1a e NPC1b de *E. granulosus* com a hNPC1L1, correspondentes à região predita como a de interação com a ezetimiba (loop C, resíduos 265-629). (A) Cores indicam a semelhança/identidade entre os aminoácidos; (B) Grau de conservação dos resíduos de aminoácidos entre as enzimas; (C) Qualidade do alinhamento baseada nos scores Blosum62.

Fig.3

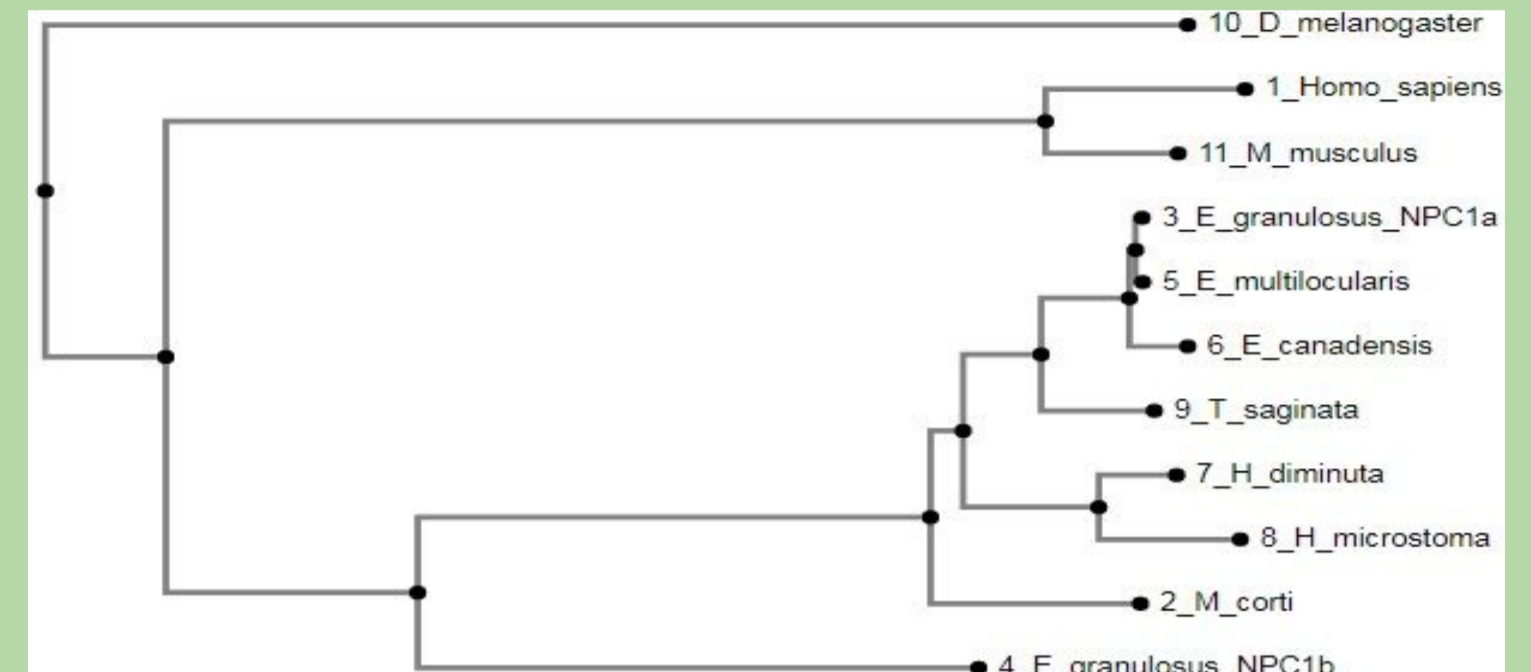


Figura 3. Árvore filogenética preliminar mostrando a conservação das sequências analisadas. Para a construção da árvore, usou-se as sequências de *D.melanogaster*, *H.sapiens*, *M.musculus*, *E.granulosus*, *E.multilocularis*, *E.canadensis*, *T.saginata*, *H.diminuta*, *H.microstoma* e *M.corti*. O método Neighbor Joining foi utilizado, *Bootstrap*=1000.

A Figura 1 mostra a estrutura dos genes codificadores da NPC1a (A) e da NPC1b (B) de *E. granulosus*. O gene da NPC1a tem 20 éxons e codifica uma proteína de 1375 aminoácidos. O gene da NPC1b tem 21 éxons e codifica uma proteínas de 1366 aminoácidos. As sequências de aminoácidos da NPC1a e NPC1b foram alinhadas com a sequência de aminoácidos da enzima hNPC1L1. Na Figura 2, é apresentado o alinhamento dos segmentos destas proteínas correspondentes à região de interação da ezetimiba com a hNPC1L1 (loop C, resíduos 265-629).

As enzimas parálogas NPC1a e NPC1b apresentam 38,7% de identidade e 26% de similaridade entre elas. As identidades/similaridades da NPC1a (28%/29,2%) e da NPC1b (30,3%/28,6%) com a hNPC1L1 também foram analisadas. Os graus de identidade/similaridade indicam homologias entre as enzimas de *E. granulosus* e a ortóloga humana suficientes para suportar a hipótese de que a ezetimiba poderá ser utilizada como um inibidor eficiente para as enzimas do parasito.

Na Figura 3, é apresentada uma árvore filogenética preliminar das enzimas NPC1a e NPC1b 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, exceptuando-se NPC1b, que divergiu bastante das demais, apesar da paralogia com a enzima NPC1a. Portanto, é observado que existe um grau maior de conservação da proteína entre grupos mais próximos filogeneticamente, embora ainda exista necessidade de refinamento das análises

Conclusão

A partir das análises foi possível verificar que há suficiente grau de conservação entre as enzimas parálogas de *E. granulosus* e a enzima hNPC1L1, e mais importante, o grau de conservação entre NPC1a/NPC1b e hNPC1L1 da porção correspondente a de interação entre a ezetimiba e a enzima, foi o suficiente.

Como perspectivas para esse projeto temos o refinamento das análises filogenéticas com a inclusão de mais sequências ortólogas da NPC1a e NPC1b de *E. granulosus*, a geração de modelos estruturais da enzimas NPC1a e NPC1b de *E. granulosus* e o uso desses modelos gerados em ensaios de docking com a ezetimiba. Além das análises *in silico*, deve-se realizar testes *in vitro* para avaliação da suscetibilidade de protoescólices de *E. granulosus* e larvas (tetratirídeos) de *M. corti* à ezetimiba.

Referências:

- [1] N.I.A. Higueta, E. Brunetti, C. McCloskey, Cystic Echinococcosis, J. Clin. Microbiol. 54 (2016) 518–523. doi:10.1128/JCM.02420-15.
- [2] A. Hemphill, B. Stadelmann, R. Rufener, M. Spiliotis, G. Boubaker, J. Müller, N. Müller, D. Gorgas, B. Gottstein, Treatment of echinococcosis: Albendazole and mebendazole-what else?, Parasite. 21 (2014). doi:10.1051/parasite/2014073.
- [3] I.J. Tsai, M. Zarowiecki, N. Holroyd, A. Garcia-Rubio, A. Sanchez-Flores, K.L. Brooks, A. Tracey, R.J. Bobes, G. Frago, E. Sciuotto, M. Aslett, H. Beasley, H.M. Bennett, J. Cai, F. Camicia, R. Clark, M. Cucher, N. De Silva, T.A. Day, P. Deplazes, K. Estrada, C. Fernández, P.W.H. Holland, J. Hou, S. Hu, T. Huckvale, S.S. Hung, L. Kamenetzky, J.A. Keane, F. Kiss, U. Koziol, O. Lambert, K. Liu, X. Luo, Y. Luo, N. MacChiaroli, S. Nichol, J. Paps, J. Parkinson, N. Pouchkina-Stantcheva, N. Riddford, M. Rosenzvit, G. Salinas, J.D. Wasmuth, M. Zamanian, Y. Zheng, X. Cai, X. Soberon, P.D. Olson, J.P. Laclette, K. Brehm, M. Berriman, E. Morett, T. Portillo, M. V. Jose, J.C. Carrero, C. Larralde, J. Morales-Montor, J. Limon-Lason, M.A. Cevallos, V. Gonzalez, A. Ochoa-Leyva, A. Landa, L. Jimenez, V. Valdes, The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism, Nature. 496 (2013) 57–63. doi:10.1038/nature12031.