

## Estudo das vias envolvidas na síntese de nucleotídeos em *Echinococcus* spp. (Platyhelminthes, Cestoda) 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.

\* Este trabalho teve também a participação do pós-doutorando Martin Cancela Sehabiague.

### Introdução

As formas larvais, metacestódeos ou cistos hidáticos (Figura 1), das espécies do complexo *Echinococcus granulosus* sensu lato (s.l.) são as causadoras da equinococose cística, 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, foi listada 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

Os objetivos deste estudo são caracterizar funcionalmente a RNR de *E. granulosus* sensu stricto, uma das espécies do complexo *E. granulosus* s.l., e avaliar a sua suscetibilidade a drogas inibidoras utilizadas como antitumorais e com potencial como anti-helmínticos.

### Materiais e métodos

#### Expressão da RNR1 recombinante

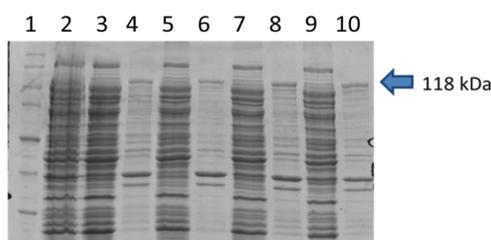
A sequência codificadora da subunidade RNR1 de *E. granulosus* s.s. foi clonada em vetor plasmidial de expressão da série pGEX para expressão em *Escherichia coli* como proteína de fusão com a glutatona-S-transferase (GST). Diferentes condições de cultivo bacteriano e de indução da expressão da RNR1-GST recombinante foram testadas. Foi também avaliada a solubilidade da RNR1-GST recombinante expressa na bactéria.

#### Expressão e purificação da RNR2 recombinante

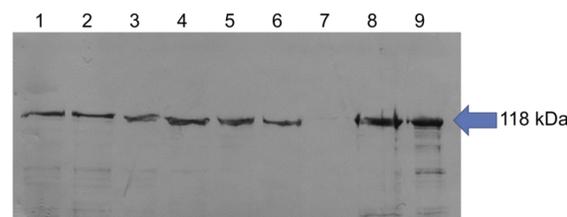
A sequência codificadora da subunidade RNR2 de *E. granulosus* s.s. foi clonada em vetor plasmidial de expressão da série pGEX para expressão em *E. coli* como proteína de fusão com a GST. A RNR2-GST recombinante, expressa na bactéria, foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de glutatona-agarose.

### Resultados

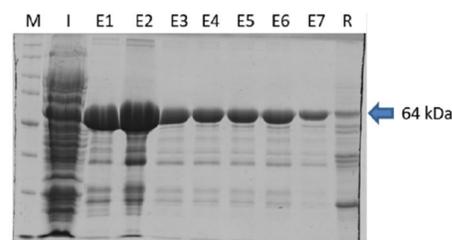
Foi realizada a produção da RNR1 recombinante. A proteína apresentou problemas de solubilidade, portanto foi realizado um teste de solubilidade em diferentes condições de sonicação e em diferentes temperaturas (Figuras 3 e 4). Não foi possível detectar a RNR1 no sobrenadante (Figura 3) e com a realização de um imunoblot foi possível confirmar a presença da RNR1 na fase solúvel (Figura 4). Foi realizada a produção da RNR2 a 15°C por 12-16h e então foi realizada sua purificação. A purificação obteve um rendimento entre 8 mg e 10 mg de proteína recombinante por litro de cultura.



**Figura 3: Teste de solubilidade da RNR1 produzida a 20°C em diferentes condições de sonicação:** 1) marcador de peso molecular; 2) induzido; 3) sobrenadante e 4) pellet solubilizado com PBS; 5) sobrenadante e 6) pellet e solubilizado com PBS 0,3 M NaCl; 7) sobrenadante e 8) pellet solubilizado com PBS 2% Triton; 9) sobrenadante e 10) pellet solubilizado com tampão de lise.



**Figura 4: Detecção por imunoblot da RNR1 no sobrenadante após sonicação:** Indução a 15°C: 1) solubilização com PBS; 2) solubilização com PBS com 1 mM de DTT e 0,3 M de NaCl; Indução a 20°C: 3) solubilização com PBS; 4) e solubilização com PBS com 0,3 M NaCl; 5) solubilização com PBS 2% Triton; 6) solubilização com tampão de lise; 7) não induzido; 8) induzido; 9) pellet após a sonicação.



**Figura 45 Purificação da RNR2:** M) marcador de peso molecular; I) extrato de *E. coli* induzido; E1-E7) eluições da resina e R) resina após a eluição.

### Perspectivas

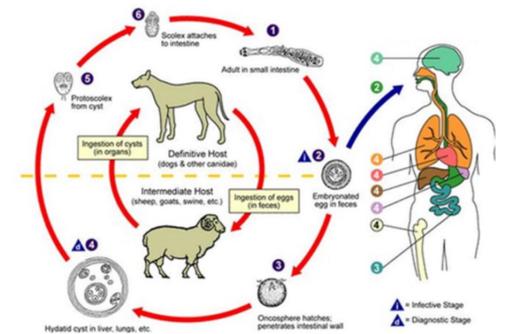
Solubilização e purificação da RNR1.

Reconstituição *in vitro* da enzima tetramérica recombinante e realização de um ensaio enzimático de atividade.

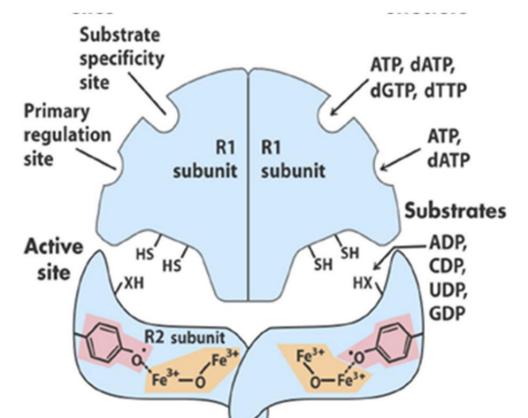
### Referências bibliográficas

(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.



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



**Figura 2: Estrutura da RNR**