

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Centro de Biotecnologia  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA – BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

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**

Trabalho de Conclusão de Curso

Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira  
Orientador  
Dr. Martin Cancela Sehabiague  
Co-orientador

Porto Alegre, junho de 2019

**Estudo das vias envolvidas na síntese de nucleotídeos em *Echinococcus* spp. (Platyhelminthes, Cestoda) para a identificação de novos alvos para o controle parasitário**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia com Habilitação em Biotecnologia Molecular.

Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Orientador

Dr. Martin Cancela Sehabiague

Co-orientador

Porto Alegre, junho de 2019

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional e no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, Prof. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pelos ensinamentos, boa vontade, paciência e pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Martin Cancela Sehabiague, pela orientação, paciência e ajuda na realização deste trabalho e pela paciência.

Aos colegas dos laboratórios 204, 206 e 210, pela colaboração e por terem me recebido tão bem.

Aos meus pais, por estimularem meus estudos e me ensinarem a sempre ser melhor.

À minha irmã, Gabriela, pela ajuda sempre, sobretudo quando eu precisei tomar uma decisão importante.

## RESUMO

*Echinococcus granulosus* sensu lato (s.l.) é um complexo de espécies crípticas, cujas formas larvais (cisto hidáticos ou metacestódeos) são causadoras de equinococose cística, uma zoonose crônica de distribuição mundial e endêmica no Cone sul da América do Sul, que traz prejuízos para a pecuária e para a saúde pública. No interior do cisto se desenvolvem os protoescólices, formas pré-adultas e infectivas para o hospedeiro definitivo. Devido à baixa eficiência dos tratamentos atuais, o desenvolvimento de novos anti-helmínticos se faz necessário. Análises *in silico* dos genomas de cestódeos listaram enzimas da via de salvação de nucleotídeos incluindo a ribonucleotídeo-redutase (RNR), como alvos para o desenvolvimento de anti-helmínticos. A RNR é um tetrâmero composto por duas subunidades RNR1 e duas subunidades RNR2. O presente trabalho buscou inicialmente avaliar as vias de síntese de nucleotídeos como potenciais alvos para o desenvolvimento de fármacos anti-helmínticos. Através de uma análise *in silico* utilizando as sequências das proteínas de ser humano foram identificados ortólogos das enzimas da via de salvação em *E. granulosus* s.s., com base nesses dados foram escolhidos genes para terem sua expressão analisada. Protoescólices foram cultivados na presença dos inibidores de RNR como a hidroxiureia (HU) (inibidor comercial) e COH29 (inibidor experimental) sendo observada a morte de alguns protoescólices 24 h e 72 h após o tratamento, também foram observadas diferenças entre a mortalidade observada em *E. granulosus* s. s. e em *Echinococcus ortleppi*, *E. ortleppi* sendo mais resistente ao tratamento. Protoescólices tratados com HU foram utilizados para a análise da expressão dos genes codificadores de hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase, de nucleosídeo-difosfato-quinase, de UMP-CMP-quinase e de CTP-sintase por qPCR. Foi observada alteração na expressão desses genes, no entanto são necessárias mais réplicas do experimento para sua validação, também foram iniciados testes para a escolha de outro gene normalizador. Além disso foram identificados *in silico* os genes codificadores das duas subunidades da RNR denominadas EgRNR1 e EgRNR2 sugerindo que a enzima ativa também é um tetrâmero nesta espécie. A expressão heteróloga e purificação da EgRNR2 já foi realizada por nosso grupo de pesquisa. Aqui, foi realizada a clonagem da sequência codificadora da EgRNR1 e a subunidade recombinante (rEgRNR1) foi expressa em *Escherichia coli*. A rEgRNR1 mostrou-se insolúvel, o que demandou a padronização das condições de expressão e purificação. Não foi possível obter a rEgRNR1 solúvel, mas sua presença no sobrenadante foi confirmada por imunoblot, em pequena quantidade sendo necessárias novas abordagens para a solubilização da rEgRNR1.

## ABSTRACT

*Echinococcus granulosus* sensu lato is a group of cryptic species whose larval stage (hydatid cyst or metacestode) cause cystic echinococcosis, a chronic zoonosis of global distribution and endemic in the Southern Cone responsible for losses to livestock and human health. Inside the cyst the protoscoleces, the pre-adult stage and infective to the definite host, are generated. Due to the low efficiency of the current treatments is necessary to develop new anthelmintic and new therapeutical strategies. *In silico* analyses listed some enzymes of the nucleotide salvage pathway including the ribonucleotide-reductase (RNR) as potential targets. The active RNR is a tetramer formed by two RNR1 subunits and two RNR2 subunits. The present study evaluated the nucleotide synthesis pathway as potential targets for anthelmintic development. *In silico* analysis using human protein sequences was used to identify orthologs of the nucleotide salvage pathway in *Echinococcus granulosus* s. s., with this data some genes were chosen for having their expression analyzed. Protoscoleces were cultivated in the presence of RNR inhibitors hydroxyurea (a commercial inhibitor) and COH29 (an experimental inhibitor) and loss of viability was observed 24 h and 72 h after treatment, different in mortality were also observed between *E. granulosus* s. s. and *Echinococcus ortleppi*, *E. ortleppi* being more resistente to the treatment. The protoscoleces were cultivated in the presence of hydroxyurea were utilized to analyze the expression of hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase and nucleoside diphosphate kinase, and UMP CMP kinase and CTP synthase coding genes. Changes in the expressions of these genes were observed, but it's necessary to replicate the experiment to validate it. In addition, the selection of a new normalization gene was initiated. The RNR subunits coding genes were identified, named EgRNR1 and EgRNR2, suggesting it's also a tetramer in this species. The heterologous expression and purification of EgRNR2 has already been done by our research group. Here, the cloning of the EgRNR1 coding sequence and the recombinant subunit was expressed in *Escherichia coli*, however the rEgRNR1 was insoluble so standardization of expression and purification conditions were tested. It wasn't possible to obtain the soluble EgRNR1, but the presence of the subunit in the supernatant was confirmed by immunoblot, but in low concentration being necessary to try new approaches to rEgRNR1 solubilization.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAs.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
<b>1.Introdução.....</b>	<b>13</b>
1.1. <i>Echinococcus granulosus</i> .....	13
1.1.1 Taxonomia.....	13
1.1.2 Ciclo de vida de <i>E.granulosus</i> s. l. ....	13
1.1.3 Epidemiologia de equinococose cística.....	14
1.1.4. Diagnóstico e tratamento de infecções por metacestódeos de <i>E. granulosus</i> s.l.....	15
1.2 Perspectivas para o desenvolvimento de novos anti-helmínticos na era pós-genômica.....	16
1.3 Vias de síntese de nucleotídeos.....	17
1.3.1 Via de salvação de nucleotídeos.....	17
1.3.2 Ribonucleotídeo-redutase.....	18
<b>2. Justificativas e objetivos.....</b>	<b>19</b>
2.1 Justificativas.....	19
2.2 Objetivos.....	22
2.2.1 Objetivo geral.....	22
2.2.2 Objetivos específicos.....	22
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>23</b>

3.1 Identificação <i>in silico</i> dos genes codificadores da via de salvação de nucleotídeos em <i>E. granulosus</i> s.s.....	23
3.2 Obtenção de protoescólices de <i>E. granulosus</i> .....	23
3.3. Cultivo de protoescólices de <i>E. granulosus</i> .....	24
3.4 Avaliação da suscetibilidade de protoescólices a inibidores da síntese de nucleotídeos.....	24
3.5 Avaliação da expressão de genes relacionados à via salvação de nucleotídeos em <i>E. granulosus</i> e sua modulação em resposta ao tratamento com HU.....	24
3.6 Clonagem molecular .....	25
3.7 Expressão em <i>E. coli</i> e purificação da rEgRNR1.....	25
3.8 Avaliação da solubilidade da rEgRNR1.....	26
<b>4. Resultados</b> .....	27
4.1 Identificação das enzimas da via de salvação de nucleotídeos de <i>E. granulosus</i> s.s.....	27
4.2 Suscetibilidade de protoescólices de <i>E. granulosus</i> s. s. e <i>E. ortleppi</i> a inibidores de RNR.....	33
4.3 Mudanças nos níveis transcricionais dos genes codificadores de enzimas da via de salvação em resposta a o inibidor HU.....	36
4.4 Clonagem da sequência codificadora de EgRNR1.....	37
4.5 Produção e purificação da rEgRNR1.....	37
<b>5. Discussão</b> .....	40
5.1 Via de salvação e tratamento de equinococose.....	40
5.2 Tratamentos com inibidores de RNR.....	45
5.3 Alterações nos níveis transcricionais dos genes da via de salvação.....	46
5.4 Produção e purificação da rEgRNR1.....	47



<b>6. Conclusões.....</b>	<b>47</b>
<b>7. Perspectivas.....</b>	<b>48</b>
<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>49</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Ciclo de vida de *E. granulosus* s. l.;

**Figura 2:** Estrutura da ribonucleotídeo-redutase.

**Figura 3:** Via de salvação de purinas proposta para *E. granulosus*.

**Figura 4:** Via de salvação de pirimidinas proposta para *E. granulosus*.

**Figura 5:** Via de salvação de pirimidinas proposta para *E. granulosus*.

**Figura 6:** Efeito de HU em protoescólices de *E. granulosus* s.s. após 24 h.

**Figura 7:** Efeito de HU em protoescólices de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* após 24 h.

**Figura 8:** Efeito de COH29 em protoescólices de *E. granulosus* s.s após 72 h.

**Figura 9:** Efeito de COH29 em protoescólices de *E. granulosus* s.s. e de *E. ortleppi* após 72 h.

**Figura 10:** Análise dos genes da via de salvação por qPCR.

**Figura 11:** A) Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do produto de amplificação da sequência codificadora da EgRNR1; B) Eletroforese em gel de agarose do amplicon do sítio de clonagem do vetor pGEX-TEV após a clonagem da sequência codificadora da RNR no vetor pGEX-TEV:

**Figura 12:** Análise por SDS-PAGE da indução da rEgRNR1 a 20°C por 4 h com diferentes concentrações de IPTG:

**Figura 13:** Análise por SDS-PAGE da indução da rEgRNR1 a 20°C por 2 h com diferentes concentrações de IPTG:

**Figura 14:** Análise da solubilidade da rEgRNR1 após a sonicação por SDS-PAGE .

**Figura 15:** Detecção por imunoblot da RNR1 no sobrenadante após a sonicação.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos utilizados para qPCR.

**Tabela 2:** Genes codificadores de transportadores de nucleosídeos encontrados no genoma de *E. granulosus* s. s. Homologia com ortólogo de seres humanos em E-value e expressão em protoescólices em FPKM

**Tabela 3:** Ortólogos da via de salvação de purinas encontrados em *E. granulosus* s. s. Homologia com ortólogo de seres humanos em E-value e expressão em protoescólices em FPKM

**Tabela 4:** Ortólogos da via de salvação de pirimidinas encontrados em *E. granulosus* s. s. Homologia com ortólogo de seres humanos em E-value e expressão em protoescólices em FPKM

**Tabela 5:** Inibidores comercialmente disponíveis para enzimas da via de salvação de purinas e pirimidinas

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**RNR:** ribonucleotídeo-redutase.

**RNR1:** subunidade maior da ribonucleotídeo-redutase.

**RNR2:** subunidade menor da ribonucleotídeo-redutase.

**EgRNR1:** subunidade maior da ribonucleotídeo-redutase de *E. granulosus*.

**rEgRNR1:** subunidade maior da ribonucleotídeo-redutase recombinante de *E. granulosus*.

**GST:** glutationa-S-transferase

**GAPDH:** gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

**CMPUMP:** UMP-CMP-quinase

**NDPK:** nucleosídeo-difosfo-quinase

**CTPS:** CTP-sintase

**HGPRT:** hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase.

**APRT:** adenina-fosforribosiltransferase.

**IMP:** inosina-monofosfato

## 1. Introdução

### 1.1 *Echinococcus granulosus*

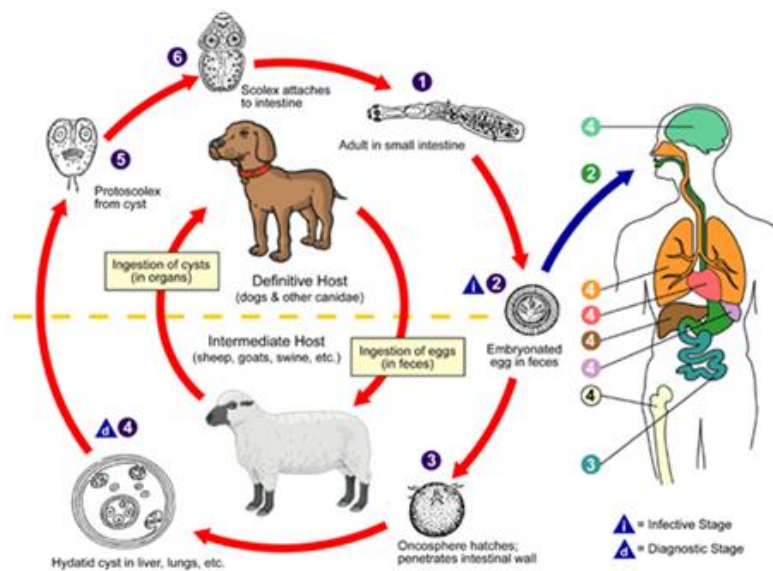
#### 1.1.1 Taxonomia

*Echinococcus granulosus* sensu lato (s.l.) é um complexo de espécies crípticas (Alvarez Rojas *et al.*, 2014) causadoras de equinococose cística. Originalmente, o complexo era considerado uma única espécie, *E. granulosus*, contendo onze genótipos (G1-G10 e a linhagem de leão) porque as espécies são morfológicamente idênticas, no entanto foi posteriormente constatado que alguns genótipos podem ser considerados espécies por satisfazerem a definição biológica de espécie. A definição atual das espécies é baseada em marcadores genéticos mitocondriais (Knapp *et al.*, 2015), como os genes da citocromo-oxidase 1, da NADH-desidrogenase subunidade 1, da citocromo b e de RNA ribossômico (rRNA) mitocondrial (Romig *et al.*, 2015), ou nucleares, como os genes de uma das subunidades da RNA-polimerase II (RPB2), da fosfoenolpiruvato-carboxiquinase I (PEPCK) e da DNA-polimerase delta (POLD) (Knapp *et al.*, 2011). Conforme os marcadores utilizados, o complexo pode ser dividido em 5 ou 6 espécies (Knapp *et al.*, 2015). Comparando diversas árvores filogenéticas foi demonstrado que *E. granulosus* s.l. é um grupo parafilético (Lymbery, 2017). Assim, a classificação atual considera como pertencentes ao complexo *E. granulosus* s.l. cinco espécies que englobam onze genótipos: *E. granulosus* sensu stricto (s.s.) (genótipos G1-G3), *Echinococcus equinus* (G4), *Echinococcus ortlepi* (G5), *Echinococcus canadensis* (G6-G10) e *Echinococcus felidis* (linhagem/genótipo de leão).

#### 1.1.2 Ciclo de vida de *E. granulosus* s. l.

As espécies do complexo *E. granulosus* s. l. necessitam de dois hospedeiros para concluir seu ciclo de vida, o hospedeiro definitivo, um carnívoro (em geral canídeos), abriga a forma adulta, uma pequena tênia que possui um segmento anterior, o escólex, no qual estão as estruturas de fixação (ganchos e ventosas) (Thompson, 2017)(Figura 1). Ao escólex se segue o estróbilo, que consiste em uma região segmentada, com, em geral, 3 a 5 proglótides, que possuem os órgãos reprodutivos masculinos e femininos e nas quais são produzidos os ovos. Os ovos são liberados junto com as fezes do hospedeiro definitivo e são ingeridos pelos hospedeiros intermediários, que podem ser espécies de ungulados (como ovinos, bovinos e suínos) ou primatas (incluindo o próprio homem). No intestino do

hospedeiro intermediário, o ovo eclode e libera uma oncosfera que migra por via sanguínea ou linfática até órgãos-alvo, principalmente fígado e pulmões onde dá origem ao metacéstódeo (cisto hidático). O cisto é formado por uma camada interna, chamada de camada germinativa, uma camada intermediária, chamada de camada laminar, e uma camada externa, chamada de camada adventícia. A camada germinativa é celularizada e é a partir dela que são geradas as formas pré-adultas, chamadas protoescólices. A camada laminar é de origem parasitária, acelular e rica em carboidratos. A camada adventícia é formada por um infiltrado de células do sistema imune do hospedeiro. O cisto hidático é preenchido pelo líquido hidático, que contém produtos de secreção e excreção do parasito e proteínas do hospedeiro. Em cistos férteis os protoescólices estão aderidos à camada germinativa ou livres no líquido hidático (Hidalgo *et al.*, 2019). O ciclo se completa quando vísceras do hospedeiro intermediário infectadas com cistos hidáticos contendo protoescólices são ingeridas pelo hospedeiro definitivo. No intestino delgado do hospedeiro definitivo, cada protoescólex dará origem a um verme adulto, num processo de estrobilização (formação das proglótides a partir do escólex).



**Figura 1:** Ciclo de vida de *E. granulosus* s. l.; (Adaptado de *The Centers for Disease Control and Prevention*, <<https://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html>> acesso em 10/06/2019 1:29)

### 1.1.3 Epidemiologia da equinococose cística

A equinococose cística é uma zoonose crônica de distribuição mundial (Deplazes *et al.*, 2017) e endêmica no Cone Sul da América do Sul, na região mediterrânea, na Ásia

central, na China ocidental e na África Oriental. A maioria dos dados epidemiológicos atuais se refere às espécies cujos hospedeiros intermediários são domesticados. A incidência anual em seres humanos é de 50 casos por 100.000 pessoas em áreas endêmicas (Agudelo Higueta *et al.*, 2016), e prevalência podendo chegar entre 5% e 10% em regiões hiperendêmicas do Peru, da Argentina, da África oriental e da China.

Apesar das espécies *E. granulosus s. s.*, *E. ortleppi* e *E. canadensis*, que compreendem 9 genótipos, serem capazes de infectar seres humanos, apenas três destes genótipos, G1 (72.9%), G6 (12.2%) e G7 (9.6%) são responsáveis pela quase totalidade das infecções em seres humanos (Cucher *et al.*, 2016). No Brasil, a equinococose é causada por *E. granulosus s. s.*, *E. ortleppi* e *E. canadensis* (Cucher *et al.*, 2016). O Rio Grande do Sul é o Estado brasileiro mais afetado, apresentando 12% do gado bovino, 17% do gado ovino e 11% dos cães infectados e uma incidência em seres humanos estimada em 1,1/100.000 habitantes por ano (Deplazes *et al.*, 2017). A infecção em gado bovino no Rio Grande do Sul é causada principalmente por *E. ortleppi* e *E. granulosus s. s.* (Urach Monteiro *et al.*, 2016). Análises de cistos férteis mostraram um aumento da prevalência de *E. ortleppi* em relação a *E. granulosus s. s.* provavelmente devido à maior adaptação de *E. ortleppi* a esse hospedeiro, existem poucos dados quanto à infecção em seres humanos devido à subnotificação dos casos, mas já foram relatadas infecções causadas pelos genótipos G1, G3 e G5 (Deplazes *et al.*, 2017).

#### **1.1.4. Diagnóstico e tratamento de infecções por metacestódeos de *E. granulosus s.l.***

As infecções pelo metacestódeo de *E. granulosus* são de difícil diagnóstico em humanos (Kern *et al.*, 2017). O diagnóstico clínico é difícil pela inespecificidade dos sintomas. Os sintomas manifestados decorrem do crescimento do cisto, de forma que o diagnóstico em geral é tardio. Os sintomas são decorrentes do dano causado ao tecido do órgão-alvo e aos tecidos adjacentes, logo, são variáveis dependendo da localização e do tamanho do cisto.

Em muitos casos o diagnóstico ocorre de forma acidental, com a identificação de cistos assintomáticos através de métodos de imagem (Al-Jawabreh *et al.*, 2017). Esses métodos revelam a presença de um cisto, mas não são capazes de definir sua etiologia, sendo necessários testes complementares para corroborar o diagnóstico. Para confirmação/especificidade pode-se utilizar testes sorológicos (Kern *et al.*, 2017) que detectam a presença de anticorpos específicos contra o parasito.

O tratamento de equinococose cística é complexo e depende do tamanho, localização e número de cistos, de forma que não se pode definir um tipo de tratamento como superior ao outro, sendo necessário avaliar cada caso independentemente (Brunetti *et al.*, 2010). A abordagem cirúrgica consiste na remoção total do cisto ou na punção e aspiração do seu conteúdo. O tratamento quimioterápico é a única alternativa disponível quando a abordagem cirúrgica não é viável (Eckert e Thompson, 2017) Ele também é utilizado no período pré-operatório, para reduzir a viabilidade do cisto, e no período pós-operatório, para impedir a reincidência da doença. Os principais fármacos utilizados são os benzimidazóis, como o albendazol e o mebendazol.

## **1.2 Perspectivas para o desenvolvimento de novos anti-helmínticos na era pós-genômica**

Dentre os organismos que são alvos de programas de administração em massa de anti-helmínticos atualmente, pode-se citar filárias, esquistossomos e nematoides transmitidos pelo solo (Geary, 2012). As drogas mais utilizadas são os benzimidazóis, que atuam sobre  $\beta$ -tubulina, as lactonas macrocíclicas, que atuam sobre canais de cloreto regulados por glutamato, e a tetra-hidropirimidinas, que atuam como agonistas nicotínicos (Abongwa *et al.*, 2017). Com exceção dos benzimidazóis, os anti-helmínticos mais utilizados têm como alvo proteínas de canais de íons. Abordagens mais atuais são a busca por alvos a partir de análises de genomas (Tsai *et al.*, 2013) e reposicionamento de fármacos desenvolvidos para outros fins, mas que apresentam ação anti-helmíntica (Pensel *et al.*, 2017).

A busca por anti-helmínticos contra cestódeos prioriza compostos que apresentem ação anti-helmíntica contra as fases larvais, responsáveis pelas formas mais graves de infecção, como a equinococose e a cisticercose (Hemphill *et al.*, 2014). Algumas das abordagens utilizadas são o reposicionamento de fármacos e o desenvolvimento direcionado de drogas específicas para proteínas do parasito inicialmente selecionadas *in silico*. O reposicionamento de fármacos se baseia na busca de fármacos utilizados no tratamento de outras doenças infecciosas humanas ou de câncer que apresentem ação anti-helmíntica. O desenvolvimento direcionado se baseia no uso dos genomas de cestódeos para a seleção de potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas de ação específica contra o parasito (Tsai *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2013).



### 1.3 Vias de síntese de nucleotídeos

As vias de síntese de nucleotídeos são de grande importância para os organismos devido ao seu papel na produção de substratos necessários para a síntese e reparo de DNA (Berens *et al.*, 1995). Há duas dessas vias, a via *de novo* e a via de salvação. A via *de novo* sintetiza nucleotídeos a partir de precursores simples, enquanto na via de salvação eles são sintetizados utilizando nucleosídeos e bases nitrogenadas livres.

#### 1.3.1 Via de salvação de nucleotídeos

A via de salvação é de grande importância para a manutenção dos níveis de nucleotídeos, especialmente em organismos incapazes de realizar a síntese *de novo*, como protozoários e helmintos parasitas (Berg *et al.*, 2010). Esta via se inicia com a captação de bases livres e nucleosídeos exógenos (Berens *et al.*, 1995). A via se inicia com a formação de nucleotídeos monofosfatados a partir de bases livres, por ação de fosforibosil-transferases, e nucleosídeos, por ação de quinases específicas para os diferentes nucleosídeos, por exemplo, adenosina-quinase. Os nucleotídeos monofosfatados são fosforilados por uma quinase específica, como adenilato-quinase, para formar nucleotídeos difosfatados que então são reduzidos por uma ribonucleotídeo-redutase gerando desoxirribonucleotídeos difosfatados que então são fosforilados por uma nucleosídeo-difosfato-quinase gerando desoxirribonucleotídeos trifosfatados. Também pode ocorrer a interconversão dos nucleosídeos através da modificação química das bases nitrogenadas gerando, no caso de purinas, intermediários de inosina. No caso de pirimidinas a modificação das bases não requer um intermediário.

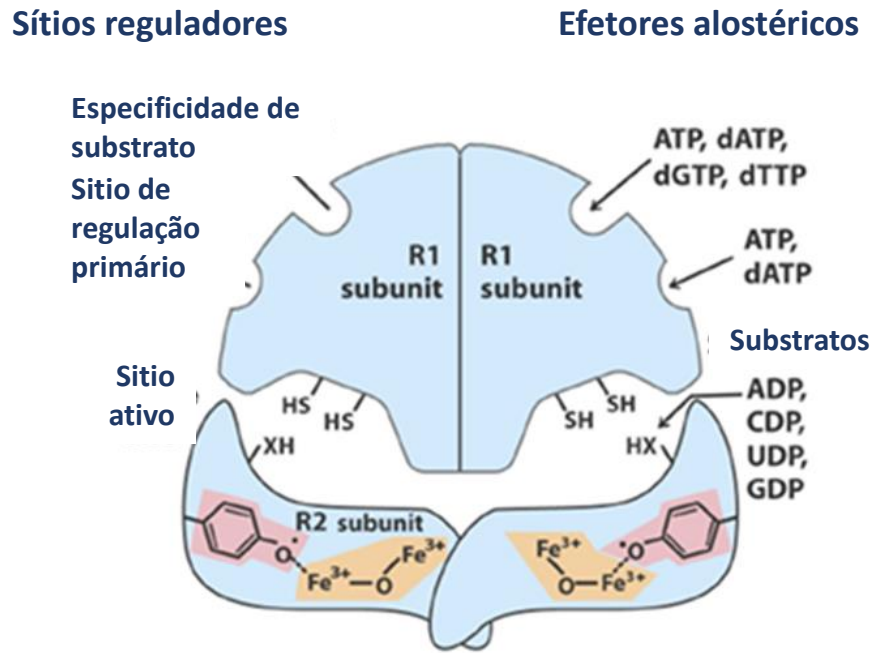
Alguns dos componentes da via de salvação são conservados mesmo entre organismos evolutivamente distantes como mamíferos, helmintos e protozoários (Berens *et al.*, 1995). Os componentes mais conservados são a nucleosídeo-difosfato-quinase e a ribonucleotídeo-redutase. Os componentes menos conservados da via são as enzimas de interconversão de bases. A presença ou ausência de enzimas envolvidas na síntese de intermediários determina a capacidade de interconversão de bases. Outra variação encontrada se refere à captação preferencial dos diferentes substratos (Hyde, 2007). O principal substrato da via de salvação em protozoários do gênero *Plasmodium* é a hipoxantina, utilizada na síntese de IMP catalisada por uma fosforibosil-transferase, enquanto em protozoários do gênero *Cryptosporidium* utilizam adenosina, convertida em AMP por adenosina-quinase, como fonte de purinas. Membros do gênero *Toxoplasma* podem utilizar ambos os mecanismos. A via de salvação de nucleotídeos foi pouco estuda

em helmintos, no entanto a ausência de enzimas chave para a síntese de nucleotídeos em nematelmintos e platelmintos indica que estes organismos devem ser dependentes da via de salvação. (Consortium, 2018) *Schistosoma mansoni* é capaz de incorporar todas as bases e nucleosídeos com exceção de xantossina, captação de nucleosídeos e bases nitrogenadas também foi observada em *Hymenolepis diminuta* (Berens *et al.*, 1995).

### 1.3.2 Ribonucleotídeo-redutase

As ribonucleotídeo-redutases (RNR) são enzimas essenciais para a sobrevivência de todos os organismos devido ao seu papel na síntese de desoxirribonucleotídeos. A RNR catalisa a redução de ribonucleotídeos, obtidos por via *de novo* ou de salvação, em desoxirribonucleotídeos, sendo de extrema importância para a síntese e reparo de DNA (Håkansson *et al.*, 2006; Aye *et al.*, 2015). Em mamíferos a RNR é um tetrâmero composto por duas subunidades RNR1 (90 kDa) e duas subunidades RNR2 (45 kDa) (Figura 2). A subunidade RNR1 contém o sítio ativo enquanto a RNR2 contém um radical tirosil-diférrico necessário para a catálise. Ambas as subunidades são expressas na fase S do ciclo celular, no entanto os níveis da RNR1 se mantêm constante durante o ciclo celular devido a sua longa vida. A subunidade RNR2 também é regulada através da sua degradação, sendo degradada após a fase S, e a sua abundância apresenta correlação com os níveis de mRNA. A enzima apresenta dois sítios para a ligação de efetores alostéricos, um dos sítios regula a especificidade de substratos de acordo com a ligação de ATP, dATP, dTTP ou dGTP ao sítio, o outro sítio regula a atividade enzimática de acordo com a ligação de dATP, uma alta razão dATP/ATP está associada a inibição da atividade enzimática.

As células do câncer apresentam elevada atividade da enzima RNR devido a sua grande demanda de desoxirribonucleotídeos para a manutenção de suas altas taxas de divisão. Pela sua importância na síntese e divisão celular a enzima foi selecionada como alvo para o desenvolvimento de vários inibidores com efeitos antitumorais (Aye *et al.*, 2015). Alguns inibidores com a gencitabina são análogos de nucleotídeos que atuam sobre a RNR1 como um inativador suicida enquanto o inibidor hidroxiureia atua sobre a subunidade RNR2 atacando o radical tirosil(Aye *et al.*, 2015).



**Figura 2:** Estrutura da ribonucleotídeo-redutase. (Adaptado de *Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition.*)

## 2. Justificativas e objetivos

### 2.1 Justificativas

As helmintíases são algumas das infecções mais comuns no mundo afetando diversas populações de regiões tropicais e subtropicais (Organização Mundial da Saúde OMS, 2019). Os principais parasitos responsáveis por essas doenças são os nematódeos transmitidos pelo solo como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale* e platelmintos trematódeos como *Schistosoma spp.*, e cestódeos, *Echinococcus spp* e *Taenia spp.* Estimativas indicam que 880 milhões de crianças necessitam tratamento para helmintíases transmitidas pelo solo e que 240 milhões de pessoas são afetados por esquistossomoses. As cestodíases, principalmente as causadas pelas formas larvais apresentam distribuição mundial e geram impactos socioeconômicos

em regiões endêmicas (Laranjo-González *et al.*, 2016; Lötsch *et al.*, 2019; Saratsis *et al.*, 2019)

As equinococoses são listadas pela OMS entre as doenças tropicais negligenciadas e são responsáveis por perdas da ordem de cerca de três bilhões de dólares em tratamento de casos humanos e em prejuízos na pecuária e de 1 milhão de *disability-adjusted life years* (DALYs), expressos como o número de anos cumulativos perdidos devido à doença ou à incapacidade ou à morte prematura por ela causada (Agudelo Higueta *et al.*, 2016). Além de resultar em aproximadamente 19.300 mortes anualmente no mundo (Torgerson *et al.*, 2015).

Atualmente não existem vacinas disponíveis para o controle de helmintos de forma que o tratamento e a profilaxia de helmintíases são dependentes de um número limitado de compostos amplamente utilizados (Taman e Azab, 2014). A disponibilidade de uma pequena variedade de drogas e seu uso frequente estimula o surgimento de resistência, já reportado em nematelmintos parasitas (Martin, 1989; Furtado *et al.*, 2016). Já foi observada a resistência aos principais anti-helmínticos de amplo espectro como os benzimidazóis/pró-benzimidazóis, tetra-hidropirimidinas e lactonas macrocíclicas em outros helmintos. Resistência a benzimidazóis já foi observada em todos os continentes com exceção da Antártida e em parasitos de relevância clínica como *Ascaris lumbricoides* (Krücken, Fraundorfer *et al.* 2017). O possível surgimento de resistência a benzimidazóis em *E. granulosus* torna o desenvolvimento de novos anti-helmínticos ainda mais necessário. No caso específico das equinococoses, o tratamento com benzimidazóis é apenas parcialmente efetivo. Uma meta-análise estimou que, mesmo após dois anos de tratamento, 40% dos cistos de *E. granulosus* permanecem ativos ou se reativam (Eckert e Thompson, 2017). A própria natureza cística da doença reduz a eficácia do tratamento, diminuindo a acessibilidade das drogas, tornando necessários tratamentos longos e com altas concentrações dos fármacos, o que é problemático quando se considera os efeitos colaterais, como hepatotoxicidade e hematotoxicidade.

Uma análise dos genomas de quatro espécies de cestódeos evidenciou a incapacidade de cestódeos de sintetizar nucleotídeos pela via *de novo* e identificou os alvos mais promissores para o desenvolvimento de fármacos contra *Echinococcus* spp, e outros cestódeos (Tsai *et al.*, 2013). Entre estes alvos estavam enzimas da via de salvação de nucleotídeos, como, por exemplo, a RNR.

A via de salvação de nucleotídeos foi pouco estudada experimentalmente em cestódeos. Os dados disponíveis limitam-se à demonstração da capacidade de captar

bases livres do meio e incorporação ao DNA em *Mesocestoides corti* e *Hymenolepis diminuta* (Heath, 1970) e à demonstração da atividade enzimática de alguns componentes dessa via em *E. multilocularis* (Suchail et al., 1998).

A capacidade de proliferação e de invasão de tecidos demonstrada por vesículas de *E. multilocularis* estimulou o interesse em testar drogas antiproliferativas para tratamento de infecções por metacestódeos de *Echinococcus* spp. (Hemphill et al., 2014). Várias dessas drogas têm como alvos enzimas da síntese de nucleotídeos, incluindo as da via de salvação. Uma dessas drogas, a 5-fluorouracila, foi testada em combinação com albendazol para o tratamento de equinococose cística obtendo resultados promissores (Pensel et al., 2017).

Estudos das vias de salvação de diversos patógenos identificaram diferenças que as tornam promissoras para o desenvolvimento de fármacos (Berg et al., 2010). Em protozoários, como *Plasmodium falciparum* (Zheng et al., 2016), foram identificadas diversas enzimas da via de salvação não encontradas em mamíferos e, em *Schistosoma mansoni*, foi possível conseguir toxicidade seletiva de análogos de purinas (El Kouni, 2017).

Devido ao seu papel na síntese de DNA, a RNR foi muito estudada como alvo para o desenvolvimento de fármacos que inibem crescimento celular (Torrents, 2014; Aye et al., 2015). Também foi observado que sua inibição resulta em morte celular por apoptose de forma que inibidores de RNR são utilizados no tratamento de câncer e de doenças causadas por protozoários e bactérias. Uma análise *in silico* de “drogabilidade” realizado com base no genoma de *E. multilocularis* listou a RNR como um dos alvos mais promissores para o desenvolvimento de anti-helmínticos (Tsai et al., 2013). A drogabilidade de uma proteína se baseia na sua capacidade de interagir com pequenas moléculas que afetam sua função biológica (Abi Hussein et al., 2017). Já foi sugerido o uso de metacestódeos de *Echinococcus* sp. como modelo para o teste de fármacos contra cestódeos e trematódeos (Hemphill et al., 2010) de forma que a avaliação das enzimas da via de salvação de nucleotídeos como potencial alvos em *E. granulosus* auxiliaria na validação dos componentes desta via como alvo em outros parasitos. Os inibidores de RNR comercialmente disponíveis podem apresentar ação anti-helmíntica o que permitiria seu uso para o tratamento de helmintíases. Esta enzima ainda é pouco estudada em *E. granulosus* s. s. não havendo dados sobre a sua cinética e interação com os inibidores conhecidos. Foram identificados, inferência por homologia, os genes codificadores das duas subunidades da RNR no genoma de *E. granulosus* o que sugere que a enzima nativa seja um tetrâmero composto por duas subunidades EgRNR1 (92 kDa) e EgRNR2 (38 kDa).

Nosso grupo de pesquisa já realizou a clonagem e purificação da EgRNR2 e a obtenção da enzima recombinante reconstituída permitirá avaliar os parâmetros cinéticos de inibição dos inibidores já conhecidos e a identificação de novos inibidores mais eficientes que possam apresentar potencial anti-helmíntico.

## **2.2 Objetivos**

### **2.2.1 Objetivo geral**

Este estudo tem como objetivo geral a identificação *in silico* das enzimas envolvidas na síntese de nucleotídeos de *E. granulosus* s.s. e a proposição e avaliação inicial de componentes desta via como alvos para o desenvolvimento de drogas antiparasitárias.

### **2.2.2 Objetivos específicos**

- i) Identificação *in silico* das enzimas da via de salvação de nucleotídeos codificadas pelo genoma de *E. granulosus* s.s.
- ii) Análise da suscetibilidade de protoescólices de *E. granulosus* a inibidores da síntese de nucleotídeos.
- iii) Avaliação da expressão em nível transcricional dos genes codificadores das enzimas da via de salvação de nucleotídeos identificadas em protoescólices e de possíveis alterações em resposta a drogas inibidoras.
- iv) Clonagem e produção da versão recombinante da subunidade EgRNR1 da RNR para posterior reconstituição da enzima funcional para ensaios enzimáticos

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Identificação *in silico* dos genes codificadores da via de salvação de nucleotídeos em *E. granulosus* s.s.

Foram utilizadas as sequências de cDNA de *E. granulosus* s. s. disponíveis em bancos de dados públicos ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) (Tsai *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2013) para a identificação de genes ortólogos de enzimas da via de salvação. Foram realizadas buscas nas sequências deduzidas de aminoácidos de *E. granulosus* s. s., utilizando o algoritmo Blastp ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e, como *query*, foram utilizadas as sequências das enzimas da via de salvação humana conhecidas (Boitz *et al.*, 2012; Fasullo e Endres, 2015), homologia com ortólogos de seres humanos expressa em *E-value* que é um parâmetro que descreve o número de *hits* que seria esperado obter ao acaso ao procurar um sequência no banco de dados. Quanto mais próximo de zero for o valor menor a chance da identificação da sequência se dever ao acaso. As sequências proteicas preditas foram analisadas utilizando as ferramentas Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) e Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) para avaliar a conservação de domínios funcionais proteicos, também foram utilizadas as ferramentas SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) para avaliar a presença de peptídeos-sinal, e as ferramentas TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) e CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) para avaliar a localização subcelular. Também foram utilizados dados de expressão de RNA-seq de protoescólices (Tsai *et al.*, 2013), expressa em FPKM, Fragmento por quilobase de exon por milhão de leituras mapeadas. FPKM, que é uma medida da concentração molar de um transcrito na amostra inicial, normalizando o comprimento do RNA e o número total de leituras na medição levando em consideração que duas leituras podem mapear o mesmo fragmento evitando que o mesmo seja contabilizado duas vezes.

#### 3.2 Obtenção de protoescólices de *E. granulosus*

Os protoescólices de *E. granulosus* foram coletados de cistos hidáticos de bovinos provenientes de frigoríficos da região metropolitana de Porto Alegre (RS). Os cistos foram puncionados e os protoescólices coletados foram lavados em PBS e armazenados a 4°C até sua utilização. A genotipagem e a determinação da espécie dos protoescólices coletados foi realizada conforme (Balbinotti *et al.*, 2012), com base na amplificação e clivagem de sequência do gene mitocondrial *COX1*.

### **3.3. Cultivo de protoescólices de *E. granulosus***

Para cultivo foram selecionadas amostras de cistos hidáticos cujos protoescólices apresentavam uma viabilidade acima de 90%. A viabilidade foi avaliada pela análise da morfologia dos protoescólices. Previamente ao cultivo, os protoescólices foram tratados com pepsina (Sigma-Aldrich) em uma concentração final de 2 mg/ml em meio Hank's pH 2,0 por 30 min, para ativação. Após 3 lavagens com PBS os protoescólices ativados foram cultivados em meio RPMI-10% SFB a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> (Arme, 1994).

### **3.4 Avaliação da suscetibilidade de protoescólices a inibidores da síntese de nucleotídeos**

Para os ensaios de inibição da síntese de nucleotídeos de *E. granulosus* s.l., protoescólices foram tratados com os compostos hidroxiureia (HU) (Sigma-Aldrich) e COH29 (Chen *et al.*, 2015), gentilmente cedido por Mei-Chuan Chen do City of Hope National Medical Center, ambos inibidores da enzima RNR. Os protoescólices foram cultivados em meio RPMI 10% SFB em ausência (controle) e em concentrações crescentes dos inibidores utilizando as concentrações previamente descritas na literatura (Chen *et al.*, 2015). Para a HU foram testadas as concentrações 5 mM, 15 mM e 50 mM e o efeito avaliado em 24 h e 48 h após o tratamento com o inibidor. Para o inibidor COH29 foram testadas as concentrações de 0,25; 0,5 e 1 mM e seu efeito avaliado nas 24 h, 48 h e 72 h após o tratamento.

### **3.5 Avaliação da expressão de genes relacionados à via salvação de nucleotídeos em *E. granulosus* e sua modulação em resposta ao tratamento com HU**

Para avaliar o efeito da HU na regulação da via de salvação de nucleotídeos foi analisada a expressão dos genes hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (EgrG\_000758800) e nucleosídeo-difosfato-quinase, (EgrG\_001117000) da via de salvação de purinas, e UMP-CMP-quinase (EgrG\_001107800) e CTP-sintase (EgrG\_000849200), da via de salvação de pirimidinas.

Foi realizada a extração de RNA total dos protoescólices incubados por 24 h em presença de HU (, 5, 15, 50 mM) e ausência (controle, H<sub>2</sub>O) utilizando Trizol (Sigma-Aldrich). A síntese de cDNA foi realizada com M-MLV *Reverse Transcriptase* (ThermoFisher). A quantificação dos níveis do mRNA para os genes alvo foi realizada por



qPCR utilizando SyBr Green e oligonucleotídeos projetados a partir das sequências nucleotídicas identificadas (Tabela 1). Como gene de referência foi inicialmente utilizado GAPDH, também foram iniciados testes com outros genes descritos previamente na literatura (EF- $\alpha$  e CYP) (Espínola *et al.*, 2014).

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos utilizados para qPCR.

Enzima		start	len	tm	gc%	seq
Hgpptase	Forward	617	23	59,96	52,17	CAGTCACTGATGTCTGTCTCCTG
	Reverse	725	22	60,19	40,91	AGAGCGTAGCCAACAACAAAAT
nucleosídeo-difosfato-quinase	Forward	1	23	60,16	43,48	ATGAGTTCTGACAGAGGGTTTCA
	Reverse	90	22	60,11	40,91	CTTGATGATTTACCAACGAGA
CTP-sintase	Forward	1473	22	60,18	40,91	CGATGTTGCTGTTGAAAGTGAT
	Reverse	1607	22	60,04	40,91	TTTACGAAACTCGGGTTGACTT
UMP-CMP-quinase	Forward	273	22	60,12	54,55	CTACAGCAGCCAGAAGTGTGTC
	Reverse	419	22	60	40,91	TCAATGCAAACGTTATCTGGAC

### 3.6 Clonagem molecular

A sequência codificadora de EgRNR1 (2469 pb) foi amplificada por PCR a partir de cDNA de protoescólices e oligonucleotídeos específicos da RNR1 projetados para recombinação *in vivo* no vetor pGEX-TEV (*forward*: 5' **TATTTTCAGGGAGAATTCCCGGGTATGCCGCCTCAGAGGCGTTGGAC** -3' e *reverse*: 5'- **GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCACTAGCCAGAGCAGTTGAC** -3'; em negrito estão indicadas as sequências complementares ao vetor). O produto de PCR foi purificado do gel de agarose utilizando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). A clonagem por recombinação foi feita utilizando protocolos previamente descritos na literatura (Parrish *et al.*, 2004). Os clones recombinantes foram identificados por PCR de colônias e o DNA plasmidial extraído utilizando o kit de miniprep (Sigma-Aldrich). A clonagem da sequência codificadora da RNR1 foi analisada por sequenciamento de DNA utilizando o kit *Dyemac ET Dye Terminator cycle sequencing* para MegaBace DNA e utilizando primers específicos para pGEX. A amplificação da sequência codificadora e a clonagem foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% utilizando o marcador *λ*hindIII e como marcador adicional foi utilizado um produto de PCR de aproximadamente 2300 pb. O vetor pGEX-TEV apresenta a sequência codificadora da glutathione-S-transferase (GST) adjacente ao sítio de clonagem

### 3.7 Expressão em *E. coli* e purificação da rEgRNR1

O vetor contendo a sequência codificadora da EgRNR1 foi utilizado para a transformação de *Escherichia coli* pLysE. Colônias isoladas foram selecionadas e as bactérias foram crescidas em 1 l de meio 2YT a 37°C até atingir uma densidade ótica a 600 nm (OD 600) entre 0,8 e 1,0. A proteína foi produzida a 37°C por 3 h com 0,1 mM de IPTG e sua solubilidade foi avaliada por SDS-PAGE 12%. O vetor pGEX-TEV contém a sequência codificadora da glutathione-S-transferase (GST) adjacente ao sítio de clonagem separada pelo sítio de clivagem da trombina permitindo a produção de uma proteína de fusão com GST, EgRNR1-GST (119 kDa) que posteriormente pode ser clivada. Também foi realizada a expressão da rEgRNR1 a 20°C por 2 h e 4 h com diferentes concentrações de IPTG (20 µM, 50 µM e 0,1 mM).

### **3.8 Avaliação da solubilidade da rEgRNR1**

A produção da rEgRNR1 nas diferentes condições testadas e a presença da mesma na fase solúvel e insolúvel foram confirmadas por SDS-PAGE 12%. Também foi realizado um imunoblot para detectar a rEgRNR1 na fase solúvel. Após o bloqueio com PBS-0,1 % Tween 20 com 5 % de leite a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal IgG anti-GST de camundongo na diluição 1: 3000 por 90 minutos a temperatura ambiente. A detecção de anticorpos ligados foi realizada incubando a membrana com anticorpo IgG anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina na diluição 1: 10 000 por 1 h a temperatura ambiente e o substrato de fosfatase alcalina SIGMAFAST™ BCIP®/NBT (Sigma-Aldrich).

## 4. Resultados

### 4.1 Identificação das enzimas da via de salvação de nucleotídeos de *E. granulosus* s. s.

A partir da análise *in silico* dos genomas de *E. granulosus* s. s. depositados foram identificados ortólogos de genes codificadores de transportadores de nucleosídeos (Tabela 2) e de enzimas da via de salvação de nucleotídeos (Tabela 3 e 4). Algumas proteínas identificadas como IMP-desidrogenase e AMP-desaminase apresentaram alta conservação com a sequência de humanos, *E-value* 0.0 e 3e-149 respectivamente. Apesar de algumas proteínas como a adenosina-quinase apresentarem baixa similaridade (*E-value*: 2.6e-5) com as sequências de humanos foi possível verificar a conservação dos domínios proteicos (Pfam carboidrato-quinase *E-value* 1.4e-46) indicando que em alguns casos, apesar da divergência de sequência a função pode ser conservada. Proteínas de *E. granulosus* que apresentaram baixa similaridade com as sequências de proteínas humanas e cujo domínio proteico indicava outra função não foram consideradas para a avaliação da via.

**Tabela 2:** Genes codificadores de transportadores de nucleosídeos encontrados no genoma de *E. granulosus* s. s. Homologia com ortólogo de seres humanos em E-value e expressão em protoescólices em FPKM

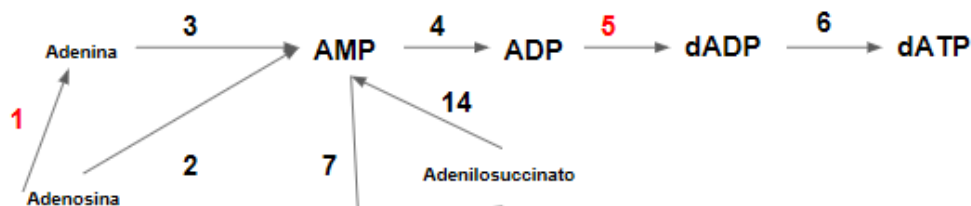
Gene humanos	Gene <i>E. granulosus</i>	<i>E-value</i>	FPKM
SLC29A1	EgrG_000609200	3.8E-29	34
SLC29A1	EgrG_000609000	2.0E-29	108
SLC29A1	EGR_03403	3.8E-29	/
SLC29A3	EGR_03405	5.2E-8	/
SLC28A2	EgrG_000127300	2.4E-30	0
SLC28A2	EGR_04180	2.1E-25	/
SLC28A3	EGR_05661	5.5E-62	/
SLC28A3	EGR_04179	1.8E-57	/
SLC28A3	EgrG_000127200	1.8E-57	6
SLC28A3	EgrG_000111600	5.5E-62	3

Para a maioria dos casos, as proteínas identificadas em um dos genomas de *E. granulosus* s. s. depositados em bancos de dados também foram identificadas no outro, sendo identificadas as mesmas enzimas e um número semelhante de genes em cada genoma. A exceção foi observada para os genes codificadores de timidina-quinase os quais foram identificados em apenas um dos genomas. No entanto a conservação dos domínios proteicos indica que isso se deve apenas a diferenças na anotação destes genes, no caso anotados como desoxinucleosídeo-quinase. Em alguns genes, como os da adenina-fosforribosiltransferase (EgrG\_000069100), da hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase

(EgrG\_000758800), da adenosina-quinase (EgrG\_000125200), da adenilosuccinato-liase (EgrG\_000054350), da timidilato-sintase (EgrG\_000260100) e da uridina-fosforilase (EgrG\_000734400), foram identificados peptídeos-sinal. Os produtos destes genes também foram preditos como sendo localizados na membrana plasmática ou em mitocôndria, ou identificados como secretados. Também foram utilizados para a análise os dados de expressão (Tsai, Zarowiecki et al. 2013). Utilizando os dados obtidos foram propostas as vias de salvação de purinas (Figura 3) e de pirimidinas (Figura 4 e 5, ) de *E. granulosus* s. s. Também foram identificados inibidores comerciais para as enzimas da via de salvação (Shannon et al., 1980; Tsai et al., 2013; Aye et al., 2015; Battelli et al., 2016; Tong et al., 2018; Ding et al., 2019; Li et al., 2019; Varghese et al., 2019).

**Tabela 3:** Ortólogos da via de salvação de purinas encontrados em *E. granulosus* s. s. Homologia com ortólogo de seres humanos em E-value e expressão em protoescólices em FPKM. Os genes codificadores de adenina-fosforribosiltransferase (EgrG\_000069100), da hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase (EgrG\_000758800), da adenosina-quinase (EgrG\_000125200) e da adenilosuccinato-liase apresentaram pep-tídeo-sinal.

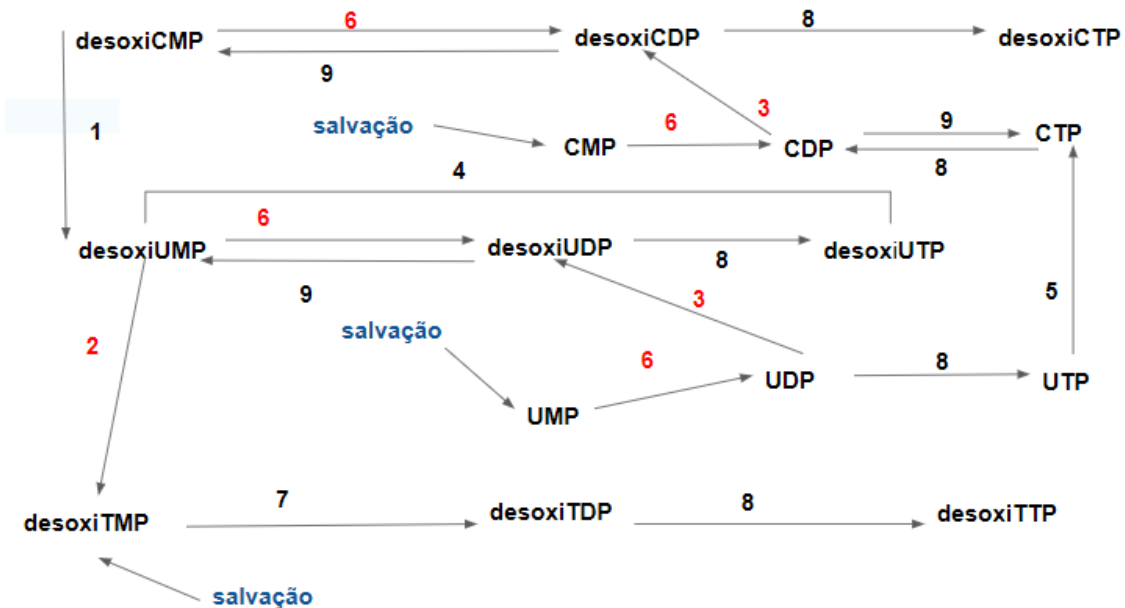
Nome	gene <i>E. granulosus</i>	E-value	FPKM
Adenosina-desaminase	EgrG_000536400	6.1E-16	12
Adenosina-desaminase	EGR_07260	6.1E-16	/
Adenina-fosforribosiltransferase	EgrG_000069100	4.3E-27	119
Adenina-fosforribosiltransferase	EGR_09920	6.6E-28	/
Hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase	EGR_06015	6.6E-37	/
Hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase	EgrG_000758800	7.5E-54	116
Hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase	EGR_06016	5.0E-31	/
Hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase	EgrG_000758900	3.5E-30	65
Nucleosídeo(purina)-fosforilase	EGR_05171	1.7E-12	/
Nucleosídeo(purina)-fosforilase	EgrG_001124500	1.10E-64	42
Nucleosídeo(purina)-fosforilase	EGR_10182	1.8E-51	/
Nucleosídeo(purina)-fosforilase	EgrG_000636000	1.8E-45	78
Nucleosídeo(purina)-fosforilase	EgrG_000635200	1.7E-97	19
Nucleosídeo(purina)-fosforilase	EGR_01914	2.0E-88	/
Nucleosídeo(purina)-fosforilase	EGR_01911	5.8E-84	/
Nucleosídeo(purina)-fosforilase	EGR_01912	3.4E-86	/
Nucleosídeo(purina)-fosforilase	EgrG_000635700	1.0E-81	2
Nucleosídeo(purina)-fosforilase	EgrG_000636100	9.1E-68	0
IMP-desidrogenase	EgrG_000120200	0	109
IMP-desidrogenase	EGR_04088	0	
Nucleosídeo-difosfato-quinase	EgrG_001145100	6.30E-29	8
Nucleosídeo-difosfato-quinase	EgrG_001117000	4.00E-35	2112
Nucleosídeo-difosfato-quinase	EGR_02422	0.0019	/
Nucleosídeo-difosfato-quinase	EGR_01942	0.068	/
Nucleosídeo-difosfato-quinase	EgrG_000638900	3.2e-9	2913
Nucleosídeo-difosfato-quinase	EGR_05582	2.60E-06	
Adenosina-quinase	EGR_04160	1.3E-14	/
Adenosina-quinase	EgrG_000125200	2.6E-5	0
Adenilosuccinato-liase	EGR_08614	2.6E-85	/
Adenilosuccinato-liase	EgrG_000054350	2.6E-85	35
Adenilosuccinato-sintase	EGR_03221	4.8E-82	/
Adenilosuccinato-sintase	EgrG_001056900	4.8E-82	60
AMP-desaminase	EgrG_000392900	2.3E-149	13
AMP-desaminase	EGR_08262	1.7E-97	/
GMP-sintase	EgrG_001198000	3.1E-93	70
GMP-sintase	EGR_08435	7.1E-87	/
Guanilato-quinase	EGR_02947	7.2E-50	/
Guanilato-quinase	EGR_10122	4.1E-38	/
Guanilato-quinase	EgrG_000170300	6.6E-30	38



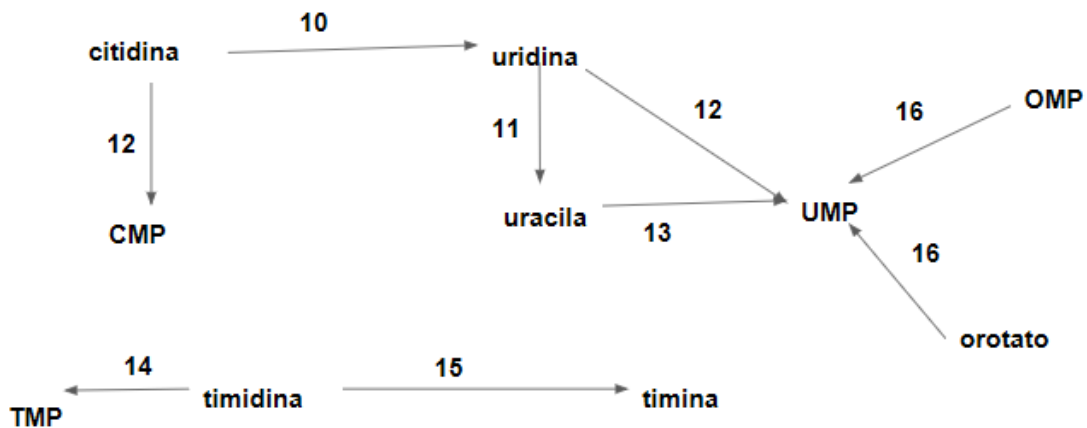
**Figura 3:** Via de salvação de purinas proposta para *E. granulosus* s. s. 1) nucleosídeo-fosforilase, 2) adenosina-quinase, 3) adenosina-fosforribosiltransferase, 4) adenilato-quinase, 5) ribonucleotídeo-redutase, 6) nucleosídeo-difosfato-quinase, 7) AMP-desaminase, 8) adenosina-desaminase, 9) hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase,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

**Tabela 4:** Ortólogos da via de salvação de pirimidinas encontrados em *E. granulosus* s. s. Homologia com ortólogo de seres humanos em E-value e expressão em protoescólices em FPKM. Os genes codificadores da timidilato-sintase (EgrG\_000260100) e da uridina-fosforilase (EgrG\_000734400) apresentaram peptideo-sinal.

Nome	gene <i>E. granulosus</i>	E-value	FPKM
Timidina-quinase	EgrG_000154200	3.3E-41	50
Timidina-quinase	EGR_09860	6.2E-7	/
Timidina-quinase	EgrG_000154250	9.5E-29	3
Timidina-quinase	EgrG_000154500	1.6E-5	290
Timidina-quinase	EGR_10731	9.2E-28	/
Timidina-quinase	EGR_10732	5.4E-23	/
Timidina-quinase	EGR_10734	5.9E-25	/
Timidilato-sintase	EgrG_000260100	1.10E-138	30
UMP-CMP-quinase	EgrG_001107800	4.30E-48	127
Citidina-desaminase	EGR_09582	4.60E-29	387
Desoxicitidilato-desaminase	EgrG_000427100	6.2e-58	94
Desoxiuridina 5'-trifosfato-nucleotídeo-hidrolase	EgrG_000119100	7.9E-59	49
Desoxiuridina 5'-trifosfato-nucleotídeo-hidrolase	EGR_04076	7.9E-59	
Timidilato-quinase	EgrG_000756200	6.3E-22	52
Timidilato-quinase	EGR_05989	6.3E-22	/
CTP-sintase	EgrG_000849200	1.3E-78	33
CTP-sintase	EGR_01526	1.3E-78	/
Uracila-fosforribosiltransferase	EGR_08921	4.7E-48	/
Uracila-fosforribosiltransferase	EgrG_000167100	5.5E-27	106
Timidina-fosforilase	EgrG_000672400	5.9E-69	4
Timidina-fosforilase	EGR_04394	5.9E-69	/
Uridina-fosforilase	EgrG_000734400	1.3E-35	165
Uridina-fosforilase	EGR_06363	7.4E-31	/
Desoxicitidina-quinase	EGR_10731	5.5E-5	/
Desoxicitidina-quinase	EGR_10734	4.3E-6	/
Desoxicitidina-quinase	EGR_10732	5.9E-6	/
Desoxicitidina-quinase	EGR_09862	1.0E-8	/
Uridina-citidina-quinase	EgrG_000188900	1.5E-29	9
Uridina-citidina-quinase	EGR_04818	1.5E-29	/
Uridina-citidina-quinase	EGR_03828	1.1E-15	/
Uridina-citidina-quinase	EgrG_000751300	1.1E-15	60
Uridine 5' monophosphate synthase	EgrG_000392000		



**Figura 4:** Via de salvação de pirimidinas proposta para *E. granulosus*. 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).



**Figura 5:** Via de salvação de pirimidinas proposta para *E. granulosus*. 10) citidina-desaminase, 11) uridina-fosforilase, 12) uridina-citidina-quinase, 13) uracila-fosforribosiltransferase, 14) timidina-quinase, 15) timidina-fosforilase, 16) uridina-5'-monofosfato-sintase (apresenta atividade de orotidina-5'-fosfato-descarboxilase e de orotato-fosforribosiltransferase.sintase)

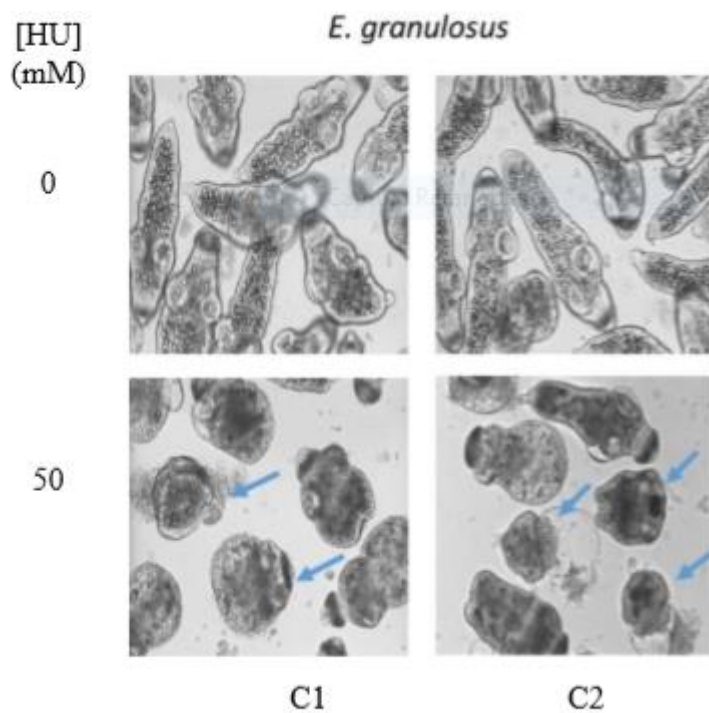


**Tabela 5:** Inibidores comercialmente disponíveis para enzimas da via de salvação de purinas e pirimidinas

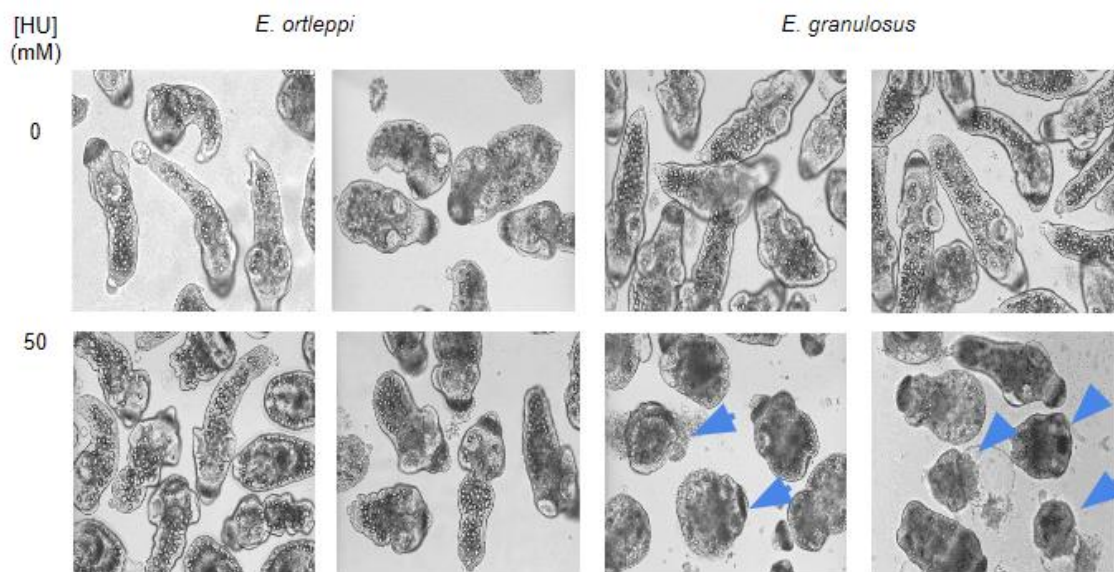
<b>Enzima</b>	<b>Inibidor</b>
Adenosina-desaminase	erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine
Hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase	Azathioprina, 6-Mercaptopurina
Nucleosídeo-fosforilase	Didanosina
IMP-desidrogenase	Ribvirina, mizoribina, merimepodib, ácido micofenólico
Ribonucleotídeo-redutase	Hidroxiureia, gencitabina
UMP-CMP-quinase	Gencitabina
Timidilato-sintase	Raltitexed, 5-fluoruracila

#### **4.2 Estudo da suscetibilidade de protoescólices de *E. granulosus* a inibidores da síntese de nucleotídeos**

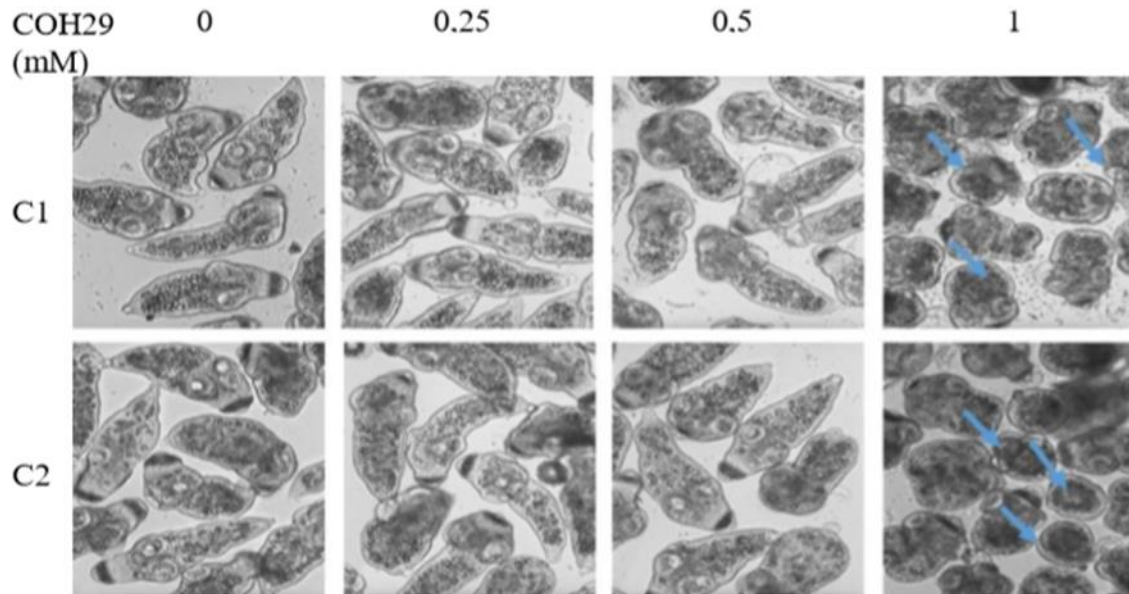
Após a genotipagem dos protoescólices foi possível identifica-los como *E. granulosus* s. s. (genótipos G1 a G3) ou como *E. ortleppi*. (genótipo G5) e os protescólices foram utilizados para os experimentos. Os efeitos de HU foram perceptíveis nas primeiras 24 h na concentração de 50 mM, observando-se a presença de alguns protoescólices mortos (Figura 6). Também foram realizados testes comparativos utilizando protoescólices de *E. ortleppi* (Figura 7). *E. ortleppi* apresentou uma menor perda de viabilidade quando comparado com *E. granulosus* s. s. após 24 h de tratamento, apesar de serem observados protoescólices mortos. Após 72 h de cultivo na presença de COH29 foi observada a perda de viabilidade na concentração de 1 mM (Figura 8). Também foram realizados testes comparativos entre *E. granulosus* s. s. e *E. ortleppi* e foi observado que novamente os protoescólices de *E. ortleppi* tiveram uma menor perda de viabilidade quando comparado com *E. granulosus* s. s. (Figura 9).



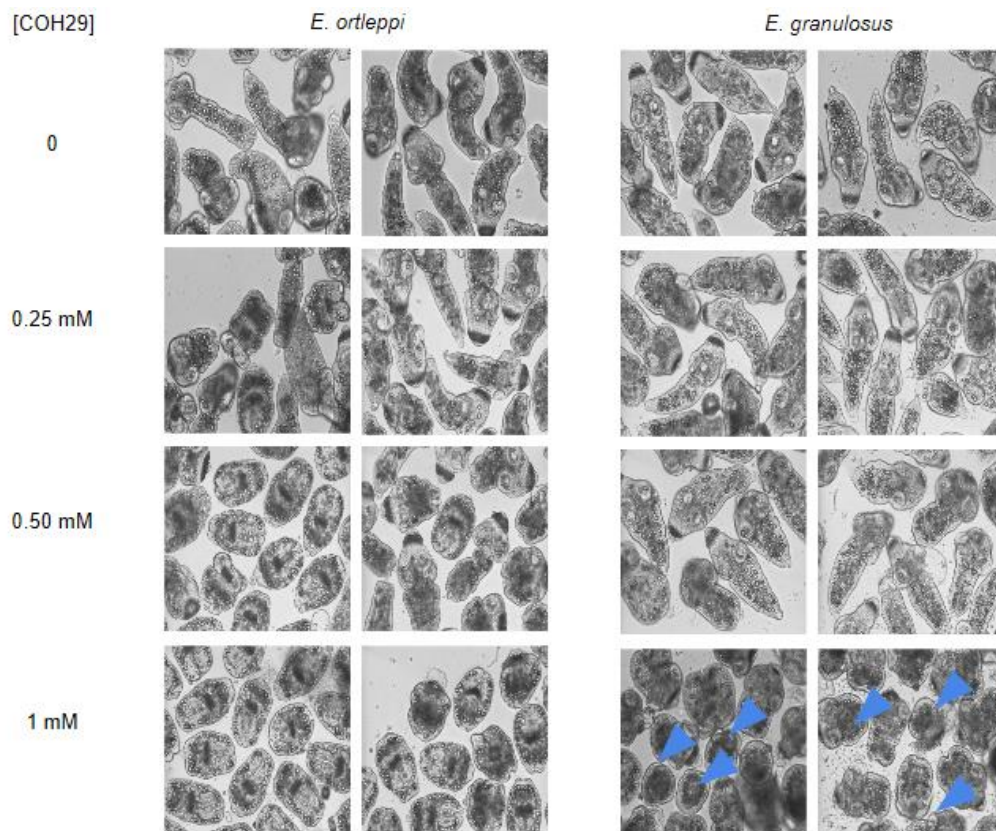
**Figura 6:** Efeito de HU em protoescolóces de *E. granulosus* s.s. após 24 h. Protoescolóces mortos indicados pelas setas azuis. C1 e C2 indicam protoescolóces provenientes de cistos diferentes



**Figura 7:** Efeito de HU em protoescolóces de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* após 24 h. Setas azuis indicam protoescolóces mortos.



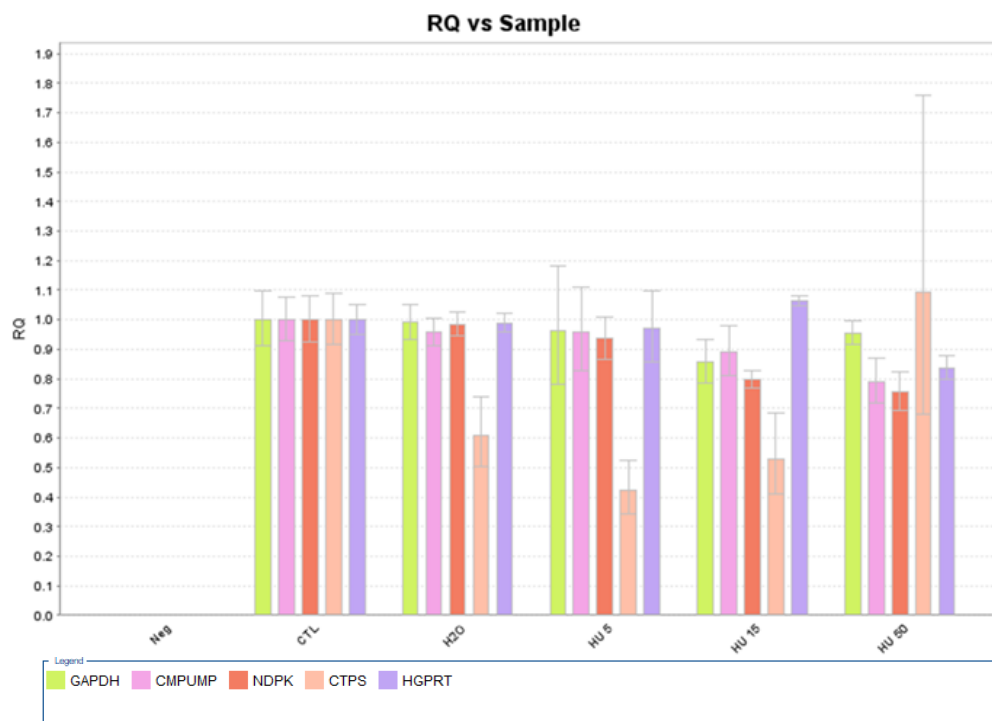
**Figura 8:** Efeito de COH29 em protoescólicas de *E. granulosa* s. s após 72 h. As setas azuis indicam protoescólicas mortas. C1 e C2 indicam protoescólicas provenientes de cistos diferentes.



**Figura 9:** Efeito de COH29 em protoescólicas de *E. granulosa* s.s. e *E. ortleppi*. As setas azuis indicam protoescólicas mortas.

### 4. 3 Avaliação preliminar dos níveis transcricionais dos genes codificadores de enzimas da via de salvação em resposta a o inibidor HU

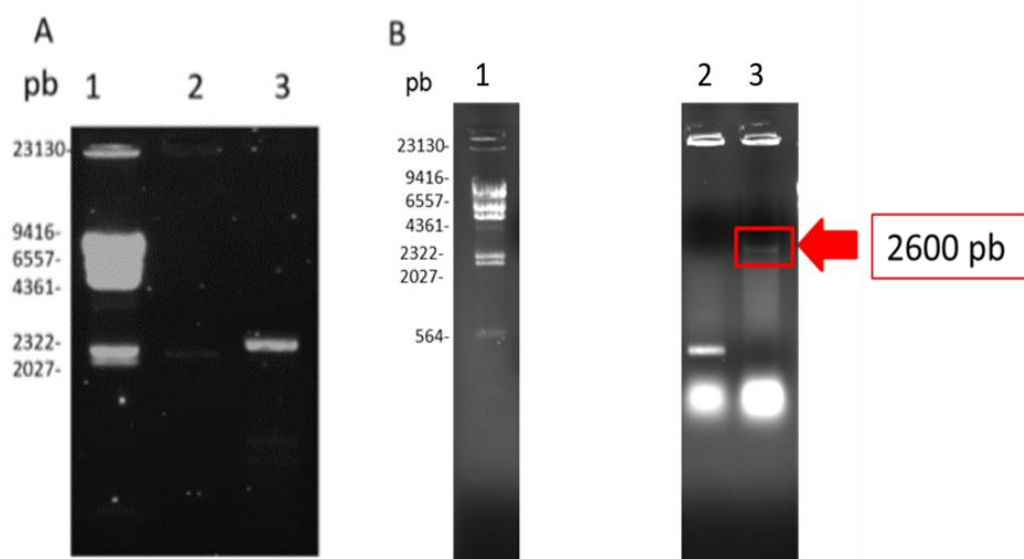
A partir dos oligonucleotídeos específicos para alguns componentes das vias de salvação de nucleotídeos (Tabela 1) foi realizada a análise da expressão dos genes selecionados sendo utilizando um único cisto. Foram observadas alterações nos níveis transcricionais dos genes analisados (Figura 10). CMPUMP e NDPK apresentaram diminuição de sua expressão com o aumento da concentração de HU, 5 Mm, 15 mM e 50 mM (CMPUMP 0.062  $\Delta\Delta$ Ct, 0.167  $\Delta\Delta$ Ct e 0.34  $\Delta\Delta$ Ct; NDPK 0.095  $\Delta\Delta$ Ct, 0,326  $\Delta\Delta$ Ct e 0,404  $\Delta\Delta$ Ct respectivamente). HGPRT apresentou aumento de sua expressão em protoescólices tratados com 15 mM de HU (-0.089  $\Delta\Delta$ Ct) e diminuição da expressão nos tratados com 5 mM E com 50 HU (0,042  $\Delta\Delta$ Ct e 0.257  $\Delta\Delta$ Ct respectivamente). CTP-sintase foi o que apresentou maior variação, apresentou diminuição no controle com água e nas concentrações 5 mM e 15 mM (0.711  $\Delta\Delta$ Ct, 0,1239  $\Delta\Delta$ Ct e 0.17  $\Delta\Delta$ Ct respectivamente) e aumento na concentração 50 Mm (-0.128  $\Delta\Delta$ Ct). O gene de referência utilizado nesse experimento apresentou variação e por isso estão sendo realizados experimentos para a escolha de um novo gene de referência bem como a coleta de novos cistos para a realização de réplicas do experimento e posterior análise estatística.



**Figura 10:** 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.

#### 4.4 Clonagem da sequência codificadora de EgRNR1

Foi realizada a amplificação da sequência codificadora da EgRNR1 a partir de cDNA de protoescólices e o amplicon de aproximadamente 2600 pb foi detectado em gel de agarose. No entanto foram observadas bandas adicionais, possivelmente dímeros de *primer* (Figura 11A) e por isso foi necessário purificar o produto de PCR, sendo obtido o produto purificado em quantidade suficiente para a clonagem. A clonagem foi realizada no vetor pGEX-TEV e confirmada por PCR do sítio de clonagem (Figura 11B).



**Figura 11:** A) Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do produto de amplificação da sequência codificadora da EgRNR1: 1) Marcador de massa molecular  $\lambda$ hindIII, 2) banda de aproximadamente 2300 pb e 3) O amplicon de aproximadamente 2500 pb. B) Eletroforese em gel de agarose do amplicon do sítio de clonagem do vetor pGEX-TEV após a clonagem da sequência codificadora da RNR no vetor pGEX-TEV: 1) marcador de tamanho molecular  $\lambda$ HindIII, 2) vetor sem a sequência codificadora da EgRNR1, 3) vetor contendo a sequência codificadora da EgRNR1. A seta vermelha indica o amplicon de cerca de 2600

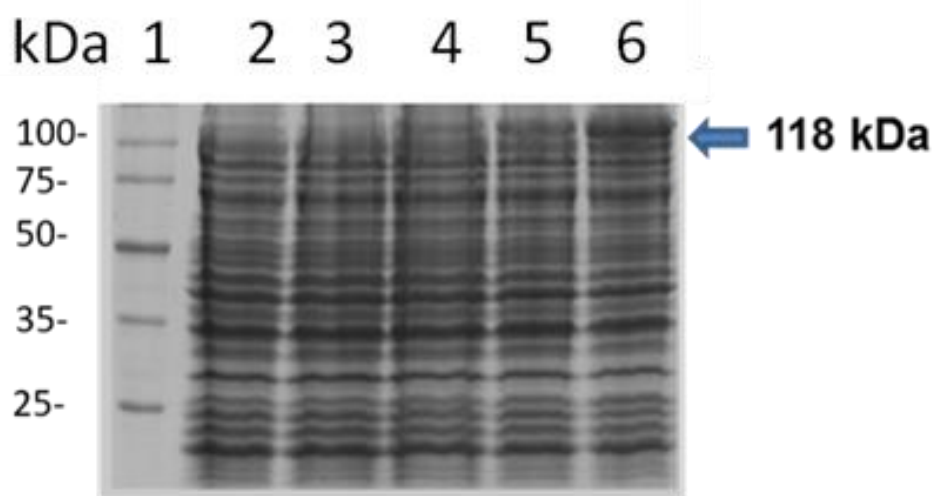
#### 4.5 Expressão heteróloga de EgRNR1

A cadeia polipeptídica foi inicialmente produzida na linhagem de *E. coli* pLysE a 37°C, mas se mostrou insolúvel. Então foram testadas diferentes condições de produção e sonicação para obter a EgRNR1 na fase solúvel.

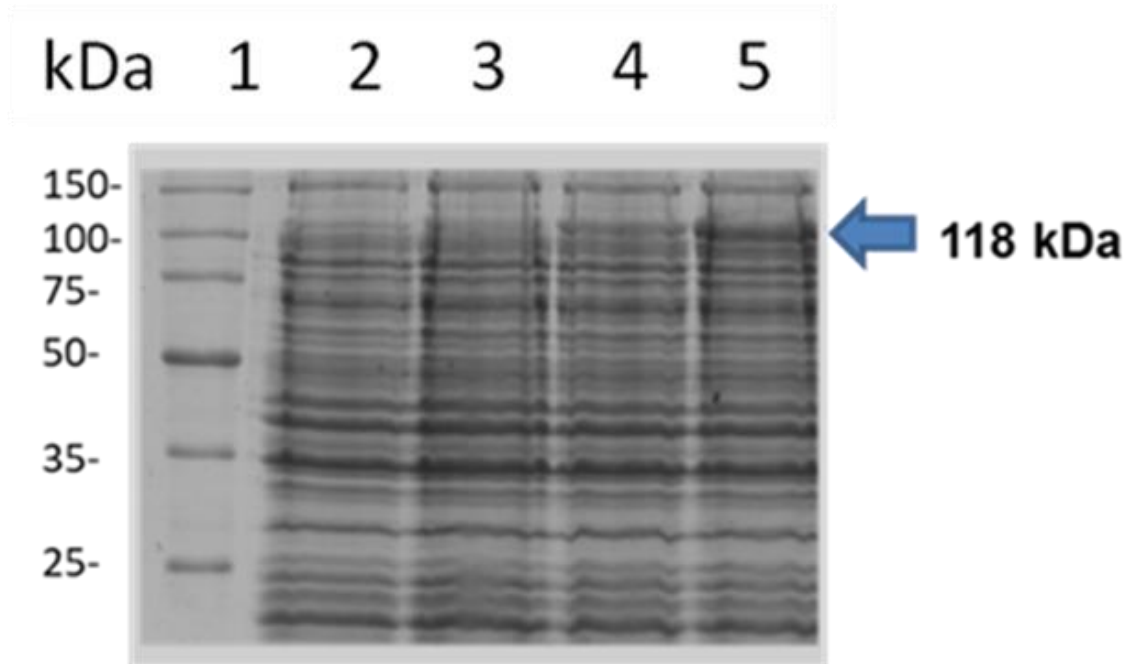
O peptídeo foi induzido a 20°C por 2 h e 4 h com diferentes concentrações de IPTG. Foi observada a expressão da rEgRNR1 após 4 h induzida com 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 0,1 mM de

IPTG (Figura 12) e após 2 h com 50  $\mu\text{M}$  e 0,1 mM de IPTG (Figura 13). Se escolheu prosseguir os experimentos com expressão por 2 h com 0,1 mM de IPTG.

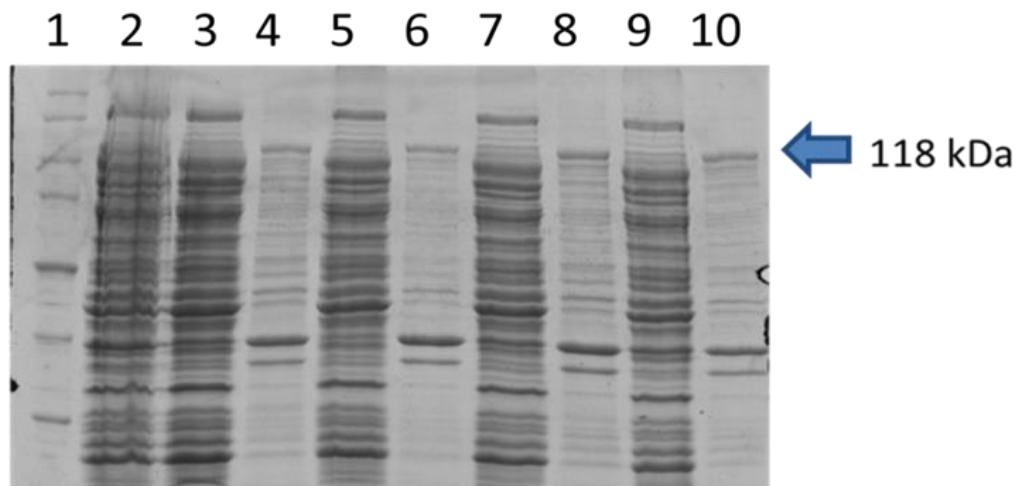
Foram testados diferentes tampões para a ressuspensão do *pellet* de bactérias para aumentar a solubilidade da proteína com PBS, com PBS-0,2% Triton, com 0,3 M de NaCl, e pellet com 0,3 M, com tampão de lise (Tris 50 mM, glicerol 10%, NaCl 500mM e realizados mais testes de solubilidade (Figura 14). Como não foi possível detectar a presença da EgRNR1 na fração solúvel por SDS-PAGE 12% foi realizada a detecção da EgRNR1 por imunoblot. Foi demonstrada a presença da EgRNR1 na fração solúvel, porém em baixa quantidade não sendo observadas diferenças entre as temperaturas e entre os tampões testados (Figura 15).



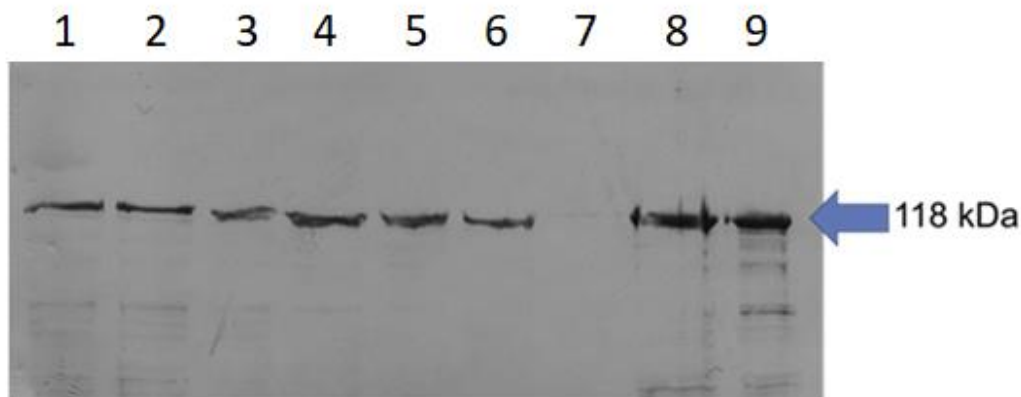
**Figura 12:** SDS-PAGE mostrando a indução da rEgRNR1 a 20°C por 4 h com diferentes concentrações de IPTG: 1) marcador de peso molecular, 2) não induzido, 3) 5  $\mu\text{M}$ , 4) 20  $\mu\text{M}$ , 5) 50  $\mu\text{M}$  e 6) 0,1 mM.



**Figura 13:** SDS-PAGE mostrando a indução da rEgRNR1 a 20°C por 2 h com diferentes concentrações de IPTG: 1) marcador de peso molecular, 2) não induzido, 3) 20  $\mu$ M, 4) 50  $\mu$ M e 5) 0,1 mM.



**Figura 14:** SDS-PAGE mostrando o teste de solubilidade da rEgRNR1 após a sonicação 1) marcador de peso molecular, 2) extrato total, 3) sobrenadante com PBS, 4) pellet com PBS, 5) sobrenadante com PBS-0,2% Triton, 6) pellet PBS-0,2% Triton, 7) sobrenadante com PBS com adição de 0,3 M de NaCl, 8) pellet com 0,3 M de NaCl, 9) sobrenadante com tampão de lise, 10) pellet com tampão de lise



**Figura 15:** Detecção por imunoblot da EgRNR1 no sobrenadante após sonicação. 1) produção a 15°C e solubilização com PBS, 2) produção a 15°C e solubilizada com PBS com 1 mM de DTT e 0,3 M NaCl, 3) produção a 20°C e solubilizado com PBS, 4) produção a 20°C e solubilizado com PBS com adição de 0,3 M NaCl, 5) produção a 20°C e solubilizado com PBS 2% Triton, 6) produção a 20°C e solubilizado com tampão de lise, 7) não induzido, 8) induzido, 9) pellet após a sonicação.

## 5. Discussão

### 5.1 Vias de síntese de nucleotídeos e tratamento de equinococose

A dependência de diversos organismos parasitas (protozoários e helmintos) da via de salvação para a síntese de purinas a torna atrativa como alvo para tratamento dessas doenças (Zheng *et al.*, 2016). A dificuldade em explorá-la se deve ao fato que seus inibidores normalmente são análogos de purinas e, portanto, muito tóxicos para o hospedeiro. A alternativa nesses casos é a identificação de diferenças entre as vias do patógeno e do hospedeiro que possam ser exploradas para o desenvolvimento de fármacos que atuem seletivamente sobre o parasito. Entre as diferenças mais procuradas são a presença de componentes da via exclusivos de um dos organismos ou diferenças de afinidade pelos substratos da via. A identificação de diferenças entre as vias permite o desenvolvimento de fármacos que atuem seletivamente contra o patógeno.

Os substratos da via de salvação precisam ser captados pelo parasito para serem utilizados, por isso são necessárias proteínas transportadoras capazes de reconhecê-los. Já foi demonstrada a capacidade de captar bases livres e nucleosídeos por outros cestódeos (Page e Macinnis, 1975) e foram encontrados no genoma de *E. granulosus* transportadores de nucleosídeos (Tabela 2). Sabe-se que a superfície de *E. multiloculares*,



envolvida na interação parasita-hospedeiro, como o exterior do metacésteo e a periferia dos protoescolícos, apresentam atividade de fosfatase-alcalina (Stettler *et al.*, 2001). A atividade dessa enzima permitiria que nucleotídeos fossem hidrolisados em nucleosídeos e captados pelo parasito através desses transportadores. Já foi demonstrado que transportadores de nucleosídeos de seres humanos também podem transportar nucleobases (Yao *et al.*, 2011). A presença destes transportadores em *E. granulosus* sugere que o metacésteo tem capacidade de captar nucleosídeos e possivelmente nucleobases do hospedeiro.

A via de salvação se inicia com a assimilação de nucleosídeos e bases nitrogenadas provenientes do hospedeiro pelo parasito. Esse processo pode ser realizado por uma quinase de nucleosídeos ou por uma fosforribosil-transferase. *E. granulosus* apresenta uma quinase de purinas, a adenosina-quinase, no entanto o gene encontrado apresentou baixo *E-value*, indicando pouca similaridade com a adenosina-quinase humana, e a sua expressão em nível de RNA, não foi detectada em análises de RNA-seq de protoescolícos de *E. granulosus* s. s. (FPKM=0) indicando que a fosforilação de nucleosídeos não é a forma principal para a salvação de purinas. Foram identificadas duas fosforribosil-transferases de purinas, uma adenina-fosforribosil-transferase (APRT) (FPKM=119) e uma hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT) (FPKM=116), também foi observada a presença de uma nucleosídeo-fosforilase (FPKM=78) que catalisa a síntese de bases livres a partir dos respectivos nucleosídeos indicando que apesar de tanto nucleosídeos como bases livres serem captadas por *E. granulosus* o principal mecanismo de salvação é a conversão de nucleosídeos em bases livres. A reação catalisada pela nucleosídeo-fosforilase produz, além de bases livres, uma  $\alpha$ -D-ribose-1-fosfato que junto com as bases nitrogenadas é um substrato para as enzimas fosforribosil-transferase. A APRT e a HGPRT catalisam a síntese de um nucleosídeo-monofosfato que então é utilizado para a síntese de ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos.

As enzimas presentes oferecem uma limitada capacidade de interconversão entre as bases nitrogenadas. Foram identificadas as enzimas adenosina-desaminase (FPKM=12) e AMP-desaminase (FPKM=13) que permitiriam a conversão de adenosina em inosina, no entanto os baixos níveis de expressão dessas enzimas indicam que esse processo não contribui significativamente para os níveis de inosina. Também não foram identificadas enzimas envolvidas na conversão de guanosina para inosina. Porém foram identificadas enzimas que permitem a síntese de nucleotídeos de adenosina e de guanosina a partir de inosina. As enzimas adenilossuccinato-sintetase e adenilossuccinato-liase permitem sintetizar

AMP a partir de IMP utilizando succinato como intermediário. No entanto as enzimas IMP-desidrogenase e GMP-sintase permitem sintetizar GMP a partir de IMP utilizando XMP como intermediário (Figura 3). Os dados obtidos indicam que não ocorre a conversão de GMP para AMP e que a conversão de AMP para GMP, se ocorre, não deve ser um fator significativo na manutenção dos níveis de GMP. Apenas IMP aparenta ser utilizado para a síntese de nucleotídeos de outra base nitrogenada.

Quando comparada com a via de salvação de purinas de mamíferos a principal diferença encontrada é a ausência de alguns componentes. Não foram identificados em *E. granulosus* genes codificadores de GMP-redutase, que catalisa a síntese de IMP a partir de GMP. Também não foram identificados genes codificadores de guanina-desaminase que catalisa a síntese de xantina a partir de guanina, e xantina-oxidase, que degrada hipoxantina e xantina em ácido úrico. Ambas enzimas estão envolvidas no catabolismo de purinas. É possível que existam outras diferenças baseadas no nível de expressão dos genes bem como na afinidade pelos diferentes substratos.

Os dados obtidos em *E. granulosus* são consistentes com os observados em outros parasitas. Aparentemente não ocorre catabolismo de purinas em protozoários e helmintos parasitas devido à ausência de xantina-oxidase. Um estudo de incorporação de nucleotídeos por esquistossomos de *S. mansoni* (Berens *et al.*, 1995) sugeriu que não há níveis significativos de adenosina-desaminase, apesar do gene codificador da enzima estar presente no genoma. A baixa expressão do gene de adenosina-desaminase encontrado em *E. granulosus*, bem como os dados de *S. mansoni* indicam que conversão de adenosina em inosina não é uma via utilizada nesses estágios do ciclo de vida dos parasitos. Os dados de expressão utilizados foram obtidos de protoescólices e, portanto, podem apresentar diferenças quando comparados com os níveis transcricionais do verme adulto.

Semelhante ao que ocorre com a síntese de purinas, *E. granulosus* não apresenta uma via *de novo* completa para a síntese de pirimidinas. Isso se deve à ausência das enzimas que catalisam os passos iniciais da via (Consortium, 2018). As enzimas da via *de novo* encontradas permitem o uso de orotato e OMP para a síntese de UMP sem, no entanto, permitir a síntese de OMP sugerindo que o mesmo deve ser captado do hospedeiro. A via de salvação de pirimidinas permite a utilização dos nucleosídeos uridina, citidina, e timidina e da base livre uracila para a geração de UMP, CMP e dTMP (Figura 4 e 5). Semelhante ao que ocorre com a salvação de purinas os nucleosídeos podem ser convertidos em bases livres, no caso uracila, por ação das enzimas citidina-desaminase e uridina-fosforilase, que então são utilizadas para a síntese de UMP catalisada por uracila-

fosforribosil-transferase. Estudos realizados com 5-fluoruracila (Pensel *et al.*, 2017) demonstram não só que esta via contribui para a síntese de nucleotídeos, mas também que o uso de inibidores de uracila-fosforribosil-transferase apresenta potencial anti-helmíntico. Diferentemente do que ocorre com a salvação de purinas é observada a presença de genes codificadores de quinases de nucleosídeos como uridina-citidina-quinase (FPKM=60) e timidina-quinase (FPKM=290), indicando que a fosforilação de nucleosídeos é um componente significativo da salvação de pirimidinas. Foram encontrados genes anotados como desoxinucleosídeo-quinase, no entanto estes genes são encontrados apenas em um dos genomas analisados. Uma possível explicação é que sejam diferenças de anotação dos mesmos genes anotados como timidina-quinase no outro genoma. Há evidências da ação de timidina-quinase no gênero *Echinococcus* visto que *E. multilocularis* é capaz de incorporar 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU), um análogo de timidina, no seu DNA (Cheng *et al.*, 2015). O parasito apresenta em seu genoma genes codificadores de timidina-fosforilase o que permite a obtenção de timina a partir de timidina, no entanto não foram encontrados mecanismos específicos para a salvação de timina.

As enzimas identificadas em *E. granulosus* permitem a conversão de nucleotídeos de uridina em nucleotídeos de citidina e de timidina. Apesar de citidina ser convertida primeiramente para UMP para ser assimilada, nucleotídeos de citidina podem ser produzidos a partir de UTP pela enzima CTP-sintase. CTP então pode ser utilizado para a síntese de RNA como também pode ser transformado em CDP por uma fosfatase e ser utilizado pela ribonucleotídeo-redutase para sintetizar dCDP. Este último por sua vez pode ser utilizado para produzir dCTP, reação catalisada por nucleosídeo-difosfato-quinase, ou ser convertido em dCMP que pode ser utilizado para produzir dUMP, pela ação de dCMP-desaminase. O dUMP pode então também ser utilizado para produzir dTMP, reação catalisada por timidilato-sintase. O único nucleosídeo que não pode ser utilizado para reações de interconversão é a timidina que é convertida em dTMP pela timidina-quinase e utilizada exclusivamente para a síntese de dTTP.

A via de salvação de pirimidinas de *E. granulosus* apresenta pouca diferença quando comparada com a via do hospedeiro. Não foi encontrada uma 5'-nucleotidase indicando que as reações de fosforilação são catalisadas por fosforilases não específicas. Também não foram identificados genes codificadores de desoxicitidina-quinase indicando que o parasito pode não ser capaz de captar esse desoxirribonucleosídeo. Foram identificados genes codificadores de desoxirribonucleosídeo-quinase, no entanto podem ser apenas genes de timidina-quinase anotados de outra forma (Tabela 4). Não se sabe a

afinidade dessas enzimas com seus substratos, em mamíferos UMP-CMP quinase atua tanto sobre ribonucleotídeos quanto sobre desoxirribonucleotídeos, da mesma forma que não é possível afirmar que os genes anotados como timidina-quinase e desoxinucleosídeo-quinase não atuem sobre mais de um substrato.

A dependência da síntese por via de salvação, a presença de enzimas propostas como alvos e a disponibilidade de inibidores contra componentes da mesma demonstram o potencial da via de salvação de purinas como alvo para desenvolvimento de anti-helmínticos (Consortium, 2018) (Tsai *et al.*, 2013). Algumas enzimas da via de salvação de purinas, como a nucleosídeo(purina)-fosforilase, a HGPRT e a IMP-desidrogenase, já haviam sido listadas como potenciais alvos em *E. multilocularis*. A ausência das enzimas guanina-desaminase e xantina-oxidase em *E. granulosus* oferece perspectivas interessantes para o tratamento de equinococose. Vários inibidores da via de salvação são catabolizados por essas enzimas (Battelli *et al.*, 2016). Assim a ausência de catabolismo de purinas impediria a degradação desses compostos pelo parasito, mas não pelo hospedeiro, permitindo que ocorra toxicidade seletiva. Já existem inibidores da via de salvação disponíveis comercialmente que poderiam ser testados para esse fim (Tabela 5). A 6-mecaptourina, por exemplo, é um inibidor de HGPRT catabolizado por xantina-oxidase. Também existe a possibilidade de serem desenvolvidos inibidores com maior afinidade pelas enzimas do parasito. Para isso serão necessários mais estudos sobre a especificidade dessas enzimas. Devido a diferenças entre os transportadores de nucleosídeos de parasitos e seus hospedeiros é possível inibir seletivamente os transportadores do parasito. Essa abordagem já foi testada em camundongos infectados com esquistossômulos *S. mansoni* com resultados promissores (El Kouni, 2017). Também é importante ressaltar que a natureza cística da equinococose é responsável pela baixa eficiência dos tratamentos atuais devido à permeabilidade seletiva do cisto (Morris *et al.*, 1987). Análogos de purinas possivelmente seriam transportados para o interior do cisto pelos mesmos transportadores utilizados para a captação de nucleosídeos e bases nitrogenadas permitindo uma maior penetração do fármaco para o interior do cisto aumentando a eficiência do tratamento.

A via de salvação de pirimidinas de *E. granulosus*, também apresenta potencial como alvo para desenvolvimento de anti-helmínticos. A via de salvação de pirimidinas normalmente oferece menos potencial como alvo para fármacos, porque poucos organismos dependem exclusivamente dela para a síntese de nucleotídeos. No entanto *E. granulosus* apresenta apenas os componentes finais da síntese *de novo*, de forma que a

via de salvação é o único meio pelo qual o parasito obtém nucleotídeos pirimidínicos. Há também evidências de que um inibidor da salvação de pirimidinas, a 5-fluoruracila, em combinação com albendazol, apresenta ação anti-helmíntica contra *E. granulosus in vitro* e *in vivo* (Pensel *et al.*, 2017). Em *E. multilocularis* o potencial da via de salvação de pirimidinas é evidenciado pelo fato de UMP-CMP quinase ser listada entre os melhores alvos para o desenvolvimento de anti-helmínticos (Tsai *et al.*, 2013). Há evidências em *S. mansoni* de que a via de salvação é mais importante para o metabolismo de pirimidinas do que a via *de novo* (El Kouni, 2017). A via de salvação de pirimidinas oferece potencial para o desenvolvimento de anti-helmínticos sendo necessária a realização de mais estudos para a validação dos alvos.

A disponibilidade de inibidores comercialmente que atuam sobre diferentes etapas da via de salvação possibilita o reposicionamento de fármacos. O reposicionamento de fármacos que foram testados em humanos para o tratamento de equinococose cística diminuiria o tempo necessário para sua utilização clínica. Na Tabela 5 estão listados alguns inibidores comercialmente disponíveis para enzimas da via de salvação. É preciso lembrar que os inibidores foram desenvolvidos para uso em humanos e, portanto, podem não ser tão eficientes no parasito, por diferenças nas enzimas ou pela ausência de enzimas necessárias para a ativação do inibidor.

## 5.2 Tratamentos com inibidores de RNR

O tratamento com HU e COH29, inibidores da RNR, resultou na perda de viabilidade de protozoários indicando o potencial anti-helmíntico de inibidores da RNR. Devido à alta concentração de HU utilizada é possível que a perda de viabilidade se deva a outro efeito do fármaco que não a inibição da RNR. Por isso foram realizados testes com outro inibidor de RNR, o inibidor experimental COH29 cujo mecanismo de inibição é diferente ao de HU (Zhou *et al.*, 2013). HU inibe a enzima RNR através da redução do radical tirosil diférrico encontrado na subunidade menor da RNR. Este radical tirosil é necessário para a redução de nucleotídeos em desoxirribonucleotídeos. Este mecanismo de redução de nucleotídeos utilizando um radical livre é conservado desde procariotos a eucariotos superior (Singh e Xu, 2016) de forma que já era esperado que HU tivesse efeito em *E. granulosus*. No entanto a HU também resulta em citotoxicidade por mecanismos independentes da inibição de RNR (Liew *et al.*, 2016). COH29 é um inibidor desenvolvido para interagir com um sítio de ligação proposto na subunidade menor da RNR de humanos. O inibidor se liga à região de interação com a subunidade maior resultando na inibição da RNR (Zhou *et al.*, 2013; Chen *et al.*,

2015). Há evidências de que COH29 também inibe reparo de DNA por união de extremidades não-homólogas. A perda de viabilidade observada em protoescólices indica que o sítio de ligação proposto é conservado na enzima de *E. granulosus* abrindo a possibilidade que outras moléculas possam ser projetadas para ação específica contra *E. granulosus*. A perda de viabilidade observada em protoescólices de *E. granulosus* s. s. e *E. ortleppi* parece confirmar o potencial da inibição de RNR para o tratamento de equinococose. O efeito observado nos protoscólices de duas espécies do gênero *Echinococcus* bem como a análise de drogabilidade com os genomas de cestódeos (Tsai *et al.*, 2013) demonstram o potencial da RNR como alvo para o desenvolvimento de anti-helmínticos contra cestódeos e possivelmente contra outros helmintos, também foi observado que *E. ortleppi* apresentou menor perda de viabilidade do que *E. granulosus* s. s. o que indica que a sensibilidade à inibidores de RNR varia de acordo com a espécie. Ainda são necessários mais dados para confirmar que a perda de viabilidade se deve a inibição de RNR e não a algum outro efeito do inibidor utilizado.

A disponibilidade de vários inibidores comerciais de RNR oferece a possibilidade de reposicionar estes fármacos para o tratamento de helmintíases. O reposicionamento de fármacos representa uma economia de recursos na obtenção de novas terapias visto que os compostos utilizados já apresentam dados clínicos. Novos compostos experimentais necessitam passar pelos vários estágios de desenvolvimento e testes antes de sua aprovação, no entanto podem ser projetados para ação específica contra o parasito enquanto os compostos comerciais disponíveis foram desenvolvidos tendo como alvo a enzima humana.

### **5.3 Alterações nos níveis transcricionais dos genes da via de salvação**

Aparentemente ocorreram alterações em resposta ao tratamento na expressão de dos genes avaliados, no entanto são necessárias mais réplicas do experimento para confirmar os resultados obtidos. O gene de referência utilizado na análise preliminar também apresentou variação na expressão, é possível que a variação no gene de referência se deve à sensibilidade da técnica, pequenas diferenças na concentração inicial das amostras da triplicata técnica poderiam ser responsáveis pela variação observada. Devido à alteração observada na expressão do gene de referência as análises posteriores irão testar outros genes de referência para identificar o controle mais adequado. Também é necessário realizar mais réplicas do experimento com protoescólices provenientes de outros cistos para confirmar a validade deste experimento.

#### 5.4 Produção e purificação da rEgRNR1

A rEgRNR1 continuou insolúvel mesmo com sua produção sendo realizada em diferentes condições e com o *pellet* sendo ressuspendido com diferentes tampões. Como observado por imunoblot o uso dos diferentes tampões não aumentou a solubilidade da rEgRNR1 de forma que esta abordagem não foi seguida. A produção a baixas temperaturas e a menores tempos reduziu a quantidade de proteína produzida, mas não aumentou sua solubilidade, indicando que a baixa solubilidade não se deve ao excesso de proteína produzida, mas sim a problemas em seu enovelamento. Alternativas para a solubilização da proteína incluem o uso de protocolos de solubilização com ureia ou sarcosil, e sua produção em diferentes linhagens de *E. coli*. O uso de protocolos de solubilização poderia gerar dificuldades para a posterior reconstituição da enzima funcional de forma que a produção do polipeptídeo em outras linhagens aparenta ser uma abordagem mais adequada.

#### 6. Conclusões

A via de síntese de nucleotídeos de *E. granulosus* apresentam potencial como alvos para tratamento de equinococose cística, potencial que pode ser explorado tanto pelo reposicionamento de alguns dos diversos fármacos que atuam sobre esta via como pelo desenvolvimento de novos fármacos com ação específica contra o parasito.

Os inibidores de RNR se mostraram eficazes para reduzir a viabilidade de protoescolícos de duas espécies do gênero *Echinococcus in vitro* demonstrando o potencial desta enzima como alvo para anti-helmíntico. Serão necessários mais estudos para demonstrar que a perda de viabilidade se deve a inibição da RNR, bem como para confirmar o potencial clínico deste fármaco no tratamento de equinococose.

Apesar de terem sido observadas alterações na expressão dos genes da via de síntese de nucleotídeos em resposta ao tratamento com HU, no entanto a variação observada na expressão do marcador bem como a ausência de réplicas impede que sejam tiradas outras conclusões.

A clonagem da sequência codificadora da EgRNR1 foi realizada com sucesso sendo obtidos clones capazes de produzir a EgRNR1, no entanto não foi possível obtê-la na fase solúvel e por isso não foi possível realizar a purificação da proteína.

## 7. Perspectivas

A partir da análise *in silico* realizada poderão ser sugeridos mais alvos nesta via para o desenvolvimento de anti-helmínticos. Os alvos poderão ser escolhidos não só com base na drogabilidade das enzimas, mas também de acordo com sua semelhança com as enzimas de seres humanos de acordo com os inibidores comerciais disponíveis.

Para melhor avaliar o potencial anti-helmíntico de inibidores de RNR será necessário realizar ensaios enzimáticos e de inibição com a enzima reconstituída sendo necessária a obtenção da rEgRNR1 purificada. A produção da rEgRNR1 em diferentes linhagens bacterianas pode auxiliar em sua solubilização com menor risco de desnaturação da cadeia polipeptídica. Após a obtenção da rEgRNR1 solúvel a proteína de fusão que poderá ser purificada utilizando a resina glutationa-Sepharose 4B e a eluição será realizada com glutationa reduzida, após a purificação a GST será clivada com a protease trombina. A rEgRNR1 então poderá ser utilizada para a reconstituição da enzima funcional junto com a EgRNR2 previamente purificada por nosso grupo. Com a enzima reconstituída será possível a realização de ensaios de cinética enzimática e de inibição que permitirão confirmar os efeitos dos inibidores testados neste trabalho sobre a ribonucleotídeo-redutase de *E. granulosus* s. s..

Para verificar o efeito do tratamento com HU na expressão dos genes da via síntese de nucleotídeos serão realizados novos testes de HU com mais cistos e realizada análises utilizando mais de um gene normalizador. Também poderá ser analisada a expressão desses genes em protoescólices cultivados na presença de nucleosídeos para avaliar a funcionalidade da via.



## 8. Referências bibliográficas

- ABI HUSSEIN, H. et al. Global vision of druggability issues: applications and perspectives. **Drug Discov Today**, v. 22, n. 2, p. 404-415, 02 2017. ISSN 1878-5832. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27939283> >.
- ABONGWA, M.; MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P. A BRIEF REVIEW ON THE MODE OF ACTION OF ANTINEMATODAL DRUGS. **Acta Vet (Beogr)**, v. 67, n. 2, p. 137-152, Jun 2017. ISSN 0567-8315. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29416226> >.
- AGUDELO HIGUITA, N. I.; BRUNETTI, E.; MCCLOSKEY, C. Cystic Echinococcosis. **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 518-23, Mar 2016. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26677245> >.
- AL-JAWABREH, A. et al. The clinical burden of human cystic echinococcosis in Palestine, 2010-2015. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 7, p. e0005717, Jul 2017. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28672021> >.
- ALVAREZ ROJAS, C. A.; ROMIG, T.; LIGHTOWLERS, M. W. Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans--review of current knowledge. **Int J Parasitol**, v. 44, n. 1, p. 9-18, Jan 2014. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269720> >.
- ARME, C. *In vitro* cultivation of parasitic helminths. **Parasitology Today**, v. 10, n. 6, p. 244, 1994. ISSN 0169-4758. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90128-7](http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758(94)90128-7) >. Acesso em: 2018/06/09.
- AYE, Y. et al. Ribonucleotide reductase and cancer: biological mechanisms and targeted therapies. **Oncogene**, v. 34, n. 16, p. 2011-21, Apr 2015. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24909171> >.
- BALBINOTTI, H. et al. Echinococcus ortleppi (G5) and Echinococcus granulosus sensu stricto (G1) loads in cattle from Southern Brazil. **Vet Parasitol**, v. 188, n. 3-4, p. 255-60, Sep 2012. ISSN 1873-2550. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22571833> >.
- BATTELLI, M. G. et al. Xanthine Oxidoreductase in Drug Metabolism: Beyond a Role as a Detoxifying Enzyme. **Curr Med Chem**, v. 23, n. 35, p. 4027-4036, 2016. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27458036> >.
- BERENS, R. L.; KRUG, E. C.; MARR, J. J. 6 - Purine and Pyrimidine Metabolism. In: MARR, J. J. e MÜLLER, M. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Parasites**. San Diego: Academic Press, 1995. p.89-117. ISBN 978-0-12-473345-9.
- BERG, M. et al. Inhibitors of the Purine Salvage Pathway: A Valuable Approach for Antiprotozoal Chemotherapy? **Curr Med Chem**, v. 17, n. 23, p. 2456-81, 2010. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20491648> >.

BOITZ, J. M. et al. Purine salvage in Leishmania: complex or simple by design? **Trends Parasitol**, v. 28, n. 8, p. 345-52, Aug 2012. ISSN 1471-5007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22726696> >.

BRUNETTI, E. et al. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. **Acta Trop**, v. 114, n. 1, p. 1-16, Apr 2010. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19931502> >.

CHEN, M. C. et al. The Novel Ribonucleotide Reductase Inhibitor COH29 Inhibits DNA Repair In Vitro. **Mol Pharmacol**, v. 87, n. 6, p. 996-1005, Jun 2015. ISSN 1521-0111. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25814515> >.

CHENG, Z. et al. A rapid and convenient method for fluorescence analysis of in vitro cultivated metacystode vesicles from Echinococcus multilocularis. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0118215, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25705880> >.

CONSORTIUM, I. H. G. Comparative genomics of the major parasitic worms. **Nat Genet**, Nov 2018. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30397333> >.

CUCHER, M. A. et al. Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of Echinococcus granulosus sensu lato in humans and natural domestic hosts. **Trop Med Int Health**, v. 21, n. 2, p. 166-75, Feb 2016. ISSN 1365-3156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26610060> >.

DEPLAZES, P. et al. Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. **Adv Parasitol**, v. 95, p. 315-493, 2017. ISSN 2163-6079. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28131365> >.

DING, W. X. et al. Raltitrexed increases radiation sensitivity of esophageal squamous carcinoma cells. **Cancer Cell Int**, v. 19, p. 36, 2019. ISSN 1475-2867. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30820189> >.

ECKERT, J.; THOMPSON, R. C. Historical Aspects of Echinococcosis. **Adv Parasitol**, v. 95, p. 1-64, 2017. ISSN 2163-6079. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28131361> >.

EL KOUNI, M. H. Pyrimidine metabolism in schistosomes: A comparison with other parasites and the search for potential chemotherapeutic targets. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 213, p. 55-80, Nov 2017. ISSN 1879-1107. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28735972> >.

ESPÍNOLA, S. M.; FERREIRA, H. B.; ZAHA, A. Validation of suitable reference genes for expression normalization in Echinococcus spp. larval stages. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102228, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25014071> >.

FASULLO, M.; ENDRES, L. Nucleotide salvage deficiencies, DNA damage and neurodegeneration. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 5, p. 9431-49, Apr 2015. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25923076> >.

FURTADO, L. F.; DE PAIVA BELLO, A. C.; RABELO, É. Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis. **Acta Trop**, v. 162, p. 95-102, Oct 2016. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27338184> >.

GEARY, T. G. Are new anthelmintics needed to eliminate human helminthiasis? **Curr Opin Infect Dis**, v. 25, n. 6, p. 709-17, Dec 2012. ISSN 1473-6527. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23041774> >.

HEATH, R. L. Biosynthesis de novo of purines and pyrimidines in Mesocestoides (Cestoda). I. **J Parasitol**, v. 56, n. 1, p. 98-102, Feb 1970. ISSN 0022-3395. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5413855> >.

HEMPHILL, A. et al. Treatment of echinococcosis: albendazole and mebendazole--what else? **Parasite**, v. 21, p. 70, 2014. ISSN 1776-1042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25526545> >.

\_\_\_\_\_. Echinococcus metacestodes as laboratory models for the screening of drugs against cestodes and trematodes. **Parasitology**, v. 137, n. 3, p. 569-87, Mar 2010. ISSN 1469-8161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19765346> >.

HIDALGO, C. et al. New insights of the local immune response against both fertile and infertile hydatid cysts. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0211542, 2019. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30699191> >.

HYDE, J. E. Targeting purine and pyrimidine metabolism in human apicomplexan parasites. **Curr Drug Targets**, v. 8, n. 1, p. 31-47, Jan 2007. ISSN 1873-5592. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266529> >.

HÅKANSSON, P.; HOFER, A.; THELANDER, L. Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. **J Biol Chem**, v. 281, n. 12, p. 7834-41, Mar 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436374> >.

KERN, P. et al. The Echinococcoses: Diagnosis, Clinical Management and Burden of Disease. **Adv Parasitol**, v. 96, p. 259-369, 2017. ISSN 2163-6079. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28212790> >.

KNAPP, J. et al. Taxonomy, phylogeny and molecular epidemiology of Echinococcus multilocularis: From fundamental knowledge to health ecology. **Vet Parasitol**, v. 213, n. 3-4, p. 85-91, Oct 2015. ISSN 1873-2550. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26260408> >.

\_\_\_\_\_. Phylogenetic relationships within Echinococcus and Taenia tapeworms (Cestoda: Taeniidae): an inference from nuclear protein-coding genes. **Mol Phylogenet Evol**, v. 61, n. 3, p. 628-38, Dec 2011. ISSN 1095-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907295> >.

LARANJO-GONZÁLEZ, M. et al. Epidemiology, impact and control of bovine cysticercosis in Europe: a systematic review. **Parasit Vectors**, v. 9, p. 81, Feb 2016. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26860313> >.

- LI, S. F. et al. In Vitro and in Vivo Antiviral Activity of Mizoribine Against Foot-And-Mouth Disease Virus. **Molecules**, v. 24, n. 9, May 2019. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31058822> >.
- LIEW, L. P. et al. Hydroxyurea-Mediated Cytotoxicity Without Inhibition of Ribonucleotide Reductase. **Cell Rep**, v. 17, n. 6, p. 1657-1670, 11 2016. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27806303> >.
- LYMBERY, A. J. Phylogenetic Pattern, Evolutionary Processes and Species Delimitation in the Genus Echinococcus. **Adv Parasitol**, v. 95, p. 111-145, 2017. ISSN 2163-6079. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28131362> >.
- LÖTSCH, F. et al. Evaluation of direct costs associated with alveolar and cystic echinococcosis in Austria. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 1, p. e0007110, 01 2019. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30703091> >.
- MARTIN, P. J. Selection for thiabendazole resistance in *Ostertagia* spp. by low efficiency anthelmintic treatment. **Int J Parasitol**, v. 19, n. 3, p. 317-25, May 1989. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2759772> >.
- MORRIS, D. L. et al. Penetration of albendazole sulphoxide into hydatid cysts. **Gut**, v. 28, n. 1, p. 75-80, Jan 1987. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3817589> >.
- PAGE, C. R.; MACINNIS, A. J. Characterization of nucleoside transport in hymenolepidid cestodes. **J Parasitol**, v. 61, n. 2, p. 281-90, Apr 1975. ISSN 0022-3395. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1079253> >.
- PARRISH, J. R. et al. High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORfs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. **J Proteome Res**, v. 3, n. 3, p. 582-6, 2004 May-Jun 2004. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15253440> >.
- PENSEL, P. E. et al. Experimental cystic echinococcosis therapy: In vitro and in vivo combined 5-fluorouracil/albendazole treatment. **Vet Parasitol**, v. 245, p. 62-70, Oct 2017. ISSN 1873-2550. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28969840> >.
- ROMIG, T.; EBI, D.; WASSERMANN, M. Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus sensu lato*. **Vet Parasitol**, v. 213, n. 3-4, p. 76-84, Oct 2015. ISSN 1873-2550. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26264250> >.
- SARATSI, A. et al. Epidemiology of *Taenia saginata* taeniosis/cysticercosis: a systematic review of the distribution in the Middle East and North Africa. **Parasit Vectors**, v. 12, n. 1, p. 113, Mar 2019. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30876439> >.
- SHANNON, W. M. et al. Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) Adenine alone and in combination with 9-beta-D-arabinofuranosyladenine in treatment of systemic herpesvirus infections in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 18, n. 4, p. 598-603, Oct 1980. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6255863> >.

SINGH, A.; XU, Y. J. The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea. **Genes (Basel)**, v. 7, n. 11, Nov 2016. ISSN 2073-4425. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27869662> >.

STETTLER, M. et al. Echinococcus multilocularis alkaline phosphatase as a marker for metacestode damage induced by in vitro drug treatment with albendazole sulfoxide and albendazole sulfone. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 8, p. 2256-62, Aug 2001. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11451682> >.

SUCHAIL, S.; SARCIRON, M. E.; PETAVY, A. F. Purine metabolism in Echinococcus multilocularis. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 120, n. 4, p. 633-7, Aug 1998. ISSN 1096-4959. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9854810> >.

TAMAN, A.; AZAB, M. Present-day anthelmintics and perspectives on future new targets. **Parasitol Res**, v. 113, n. 7, p. 2425-33, Jul 2014. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24894082> >.

THOMPSON, R. C. Biology and Systematics of Echinococcus. **Adv Parasitol**, v. 95, p. 65-109, 2017. ISSN 2163-6079. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28131366> >.

TONG, X. et al. Merimepodib, an IMPDH inhibitor, suppresses replication of Zika virus and other emerging viral pathogens. **Antiviral Res**, v. 149, p. 34-40, 01 2018. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29126899> >.

TORGERSON, P. R. et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. **PLoS Med**, v. 12, n. 12, p. e1001920, Dec 2015. ISSN 1549-1676. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26633705> >.

TORRENTS, E. Ribonucleotide reductases: essential enzymes for bacterial life. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 4, p. 52, 2014. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24809024> >.

TSAI, I. J. et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. **Nature**, v. 496, n. 7443, p. 57-63, Apr 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23485966> >.

URACH MONTEIRO, D. et al. Echinococcus granulosus sensu stricto, Echinococcus canadensis (G7), and Echinococcus ortleppi in fertile hydatid cysts isolated from cattle in Southern Brazil. **Acta Trop**, v. 164, p. 41-44, Dec 2016. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27554941> >.

VARGHESE, V. et al. FOXM1 modulates 5-FU resistance in colorectal cancer through regulating TYMS expression. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 1505, Feb 2019. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30728402> >.

YAO, S. Y. et al. Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). **J Biol Chem**, v. 286, n. 37, p. 32552-62, Sep 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21795683> >.

ZHENG, H. et al. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. **Nat Genet**, v. 45, n. 10, p. 1168-75, Oct 2013. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24013640> >.

ZHENG, Z. et al. Novel nucleoside-based antimalarial compounds. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 26, n. 12, p. 2861-2865, 06 2016. ISSN 1464-3405. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156774> >.

ZHOU, B. et al. A small-molecule blocking ribonucleotide reductase holoenzyme formation inhibits cancer cell growth and overcomes drug resistance. **Cancer Res**, v. 73, n. 21, p. 6484-93, Nov 2013. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24072748> >.

World Health Organization. Disponível em: <[https://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)>. Acesso em: 15 jun. 2019.