

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Avaliação da HMG-CoA-redutase como alvo para o reposicionamento de fármacos
como novos anti-helmínticos**

Dissertação de Mestrado

Marina Monteiro Guedes

Porto Alegre, Março de 2022.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Avaliação da HMG-CoA-redutase como alvo para o reposicionamento de fármacos
como novos anti-helmínticos**

Marina Monteiro Guedes

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, Março de 2022.

CIP - Catalogação na Publicação

Guedes, Marina Monteiro
Avaliação da HMG-CoA-redutase como alvo para o reposicionamento de fármacos como novos anti-helmínticos / Marina Monteiro Guedes. -- 2022. 48 f.
Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Platyhelminthes. 2. HMG-CoA-redutase . 3. Mesocostoides corti. 4. Estatinas. I. Bunselmeyer Ferreira, Henrique, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot/Ufrgs), com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela dedicação e orientação deste trabalho.

Ao Jeferson, que me ajudou desde o início, por toda dedicação e pela paciência em tentar esclarecer minhas dúvidas no desenvolvimento deste trabalho, mas principalmente por todo o carinho e amizade que se desenvolveu durante este tempo que trabalhamos juntos.

Aos colegas de laboratório, que, de forma direta ou indireta, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Agradecimento em especial aos integrantes do time meso: Jeferson, Gabi, Isabela e Lorenzo, pela parceria e colaboração.

À minha família, minha mãe Edite e a minha irmã Tatiana, que sempre me apoiaram e incentivaram desde o início. À minha prima Luciana e a minha tia Lurdes, pelo incentivo e apoio nos momentos difíceis. E especialmente para a minha mãe, por acreditar em mim, sempre apoiar as minhas decisões e por ter me dado todo o suporte necessário para que eu pudesse concluir uma as etapas mais importantes da minha vida.

Aos meus amigos, Raquel, Franciely, Aline, Clara, Daniel, Ludy e à Kassiane, pelo companheirismo durante esses anos, por todo o apoio e amizade que foram essenciais em tempos de pandemia. Em especial, à Franciely pela amizade que cultivamos desde o início da graduação e mesmo com o distanciamento social a amizade se manteve viva e forte.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Lista de abreviaturas, símbolos e unidades..... | 08 |
| Lista de figuras..... | 09 |
| Lista de tabelas..... | 09 |
| Resumo..... | 10 |
| Abstract..... | 11 |
| 1. Introdução..... | 13 |
| 1.1. Filo Platyhelminthes..... | 13 |
| 1.2. Doenças causadas por cestódeos..... | 14 |
| 1.2.1. Equinococoses..... | 15 |
| 1.2.2. Cisticercoses..... | 17 |
| 1.3. Tratamento de cestodíases e reposicionamento de fármacos..... | 18 |
| 1.4. HMG-CoA-redutase e as estatinas..... | 20 |
| 1.5. <i>M. corti</i> como organismo-modelo..... | 21 |
| 2. Justificativas..... | 24 |
| 3. Objetivos..... | 25 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 25 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 25 |
| 4. Materiais e Métodos..... | 25 |
| 4.1. Identificação de ortólogos da HMG-CoA-redutase em helmintos parasitas e seus respectivos hospedeiros..... | 25 |
| 4.2. Análise filogenética da HMG-CoA-redutase em helmintos parasitas e seus respectivos hospedeiros..... | 26 |
| 4.3. Predições da estrutura tridimensional da HMG-CoA-redutase de cestódeos..... | 26 |
| 4.4. Predição dos modos de interação da sinvastatina ou da fluvastatina com as HMG-CoA-redutases de cestódeos..... | 27 |
| 5. Resultados..... | 28 |
| 5.1. Recuperação e definição das sequências de HMG-CoA-redutase de helmintos e nematódeos parasitas e seus respectivos hospedeiros..... | 28 |
| 5.2. Avaliação da conservação evolutiva das sequências de aminoácidos da HMG-CoA-redutase de helmintos parasitas e seus respectivos hospedeiros..... | 30 |
| 5.3. Avaliação da conservação evolutiva de estruturas das HMG-CoA-redutases dos cestódeos <i>M. corti</i> , <i>E. multilocularis</i> , <i>E. granulosus</i> e <i>T. solium</i> | 31 |
| 5.4. Interações da sinvastatina e da fluvastatina com o sítio ativo das HMG-CoA-redutases dos cestódeos <i>M. corti</i> , <i>E. multilocularis</i> , <i>E. granulosus</i> e <i>T. solium</i> | 33 |

| | |
|--|----|
| 6. Discussão..... | 36 |
| 7. Conclusões..... | 38 |
| 8. Perspectivas..... | 38 |
| Referências Bibliográficas..... | 39 |
| Apêndice I - Figuras suplementares..... | 45 |
| Apêndice II - Materiais suplementares..... | 47 |
| Anexo - Curriculum Vitae..... | 71 |

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

- aa:** aminoácidos
- ADP:** adenosina-5-difosfato
- Arg:** arginina
- Asn:** asparagina
- Asp:** ácido aspártico
- BLAST:** ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*)
- CoA:** coenzima A
- DNA:** ácido desoxirribonucleico
- EgHMGCR:** HMG-CoA-redutase de *Echinococcus granulosus*
- EmHMGCR:** HMG-CoA-redutase de *Echinococcus multilocularis*
- Glu:** aminoácido ácido glutâmico
- GMQE:** estimativa global de qualidade do modelo (do inglês, *global model quality estimation*)
- HMG-CoA-redutase:** 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase
- HMMs:** modelo oculto de Markov (do inglês, *hidden Markov model*)
- HsHMG-CoA-redutase:** HMG-CoA-redutase de *Homo sapiens*
- Lys:** lisina
- McosHMGCR:** HMG-CoA-redutase de *Mesocestoides corti*
- ML:** máxima verossimilhança
- mRNA:** ácido ribonucleico mensageiro
- NAD:** nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
- NADP:** nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato
- OMS:** Organização Mundial da Saúde
- PAIR:** punção, aspiração, injeção, re-aspiração
- PDB:** banco de dados de proteínas (do inglês, *Protein Data Bank*)
- QMEAN:** modelo qualitativo de análise energética (do inglês, *Qualitative Model Energy Analysis*)
- RNA-seq:** sequenciamento de RNA (do inglês, *RNA sequencing*)
- Ser:** serina
- TsHMGCR:** HMG-CoA-redutase de *Taenia solium*

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representação do ciclo de vida do complexo <i>E. granulosus</i> sensu lato e <i>E. multilocularis</i> | 16 |
| Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida de <i>T. solium</i> | 18 |
| Figura 3. Representação esquemática do ciclo de vida de <i>M. corti</i> | 19 |
| Figura 4. Representação das HMG-CoA-redutases de classe I e classe II..... | 22 |
| Figura 5. Visão geral da via do mevalonato..... | 23 |
| Figura 6. Representação da estrutura química das estatinas..... | 23 |
| Figura 7. Árvore filogenética da HMG-CoA-redutase de helmintos parasitas e seus respectivos hospedeiro..... | 31 |
| Figura 8. Estruturas tridimensionais da McosHMGCR, da EmHMGCR, da e da TsHMGCR..... | 32 |
| Figura 9. Comparação de McosHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR..... | 33 |
| Figura 10. Representação dos modos de interação da sinvastatina ou fluvastatina com McosHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR..... | 35 |
| Figura suplementar 1. Alinhamento das sequências de aminoácidos das HMG-CoA-redutases de platelmintos, nematódeos e seus respectivos hospedeiros..... | 45 |
| Figura suplementar 2. Comparação das estruturas tridimensionais da HMG-CoA-redutase dos diferents cestódeos e da hHMGCR (PDB: 1hw9)..... | 46 |
| Figura suplementar 3. Representação dos modos de intereação da sinvastatina ou fluvastatina com a HsHMGCR..... | 46 |

Lista de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Conservação relativa das sequências deduzidas de aminoácidos da HMG-CoA-redutase em diferentes parasitas e seus respectivos hospedeiros..... | 29 |
| Tabela 2. Resultados de <i>docking</i> molecular dos fármacos sinvastatina e fluvastatina..... | 34 |

RESUMO

Cestódeos são vermes parasitas capazes de infectar uma grande variedade de mamíferos, incluindo os seres humanos. Facilmente transmitidos entre hospedeiros, causam doenças (cestodíases) de relevância médica e veterinária, como as equinococoses (causadas pela fase larval de *Echinococcus* spp.) e as cisticercoses (causadas pela fase larval de *Taenia solium*). O tratamento de cestodíases viscerais como estas geralmente se baseia no uso de benzimidazóis e praziquantel, que não são eficazes contra infecções causadas por cestódeos em seus estágios larvais. Portanto, novos anti-helmínticos mais eficazes são necessários para o tratamento de cestodíases viscerais. Nesse contexto, o reposicionamento de fármacos é uma estratégia atraente. Em cestódeos e outros helmintos, a via do mevalonato é essencial devido à sua importância em processos como ubiquitinação, prenitação e a glicosilação de proteínas. Assim, enzimas desta via têm sido propostas como alvos potenciais para o desenvolvimento de novos anti-helmínticos. Neste trabalho, o potencial da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) redutase (enzima central da via do mevalonato) como alvo terapêutico em cestódeos está sendo avaliado juntamente com o reposicionamento de estatinas inibidoras da HMG-CoA-redutase (atualmente usadas para tratar a hipercolesterolemia em humanos) como novos anti-helmínticos. Para a identificação e definição das sequências de aminoácidos de proteínas ortólogas da HMG-CoA-redutase em platelmintos, nematódeos e seus respectivos hospedeiros, as sequências de aminoácidos de proteínas ortólogas da HMG-CoA-redutase de bancos de dados públicos foram recuperadas e alinhadas. Um total de 101 sequências de aminoácidos de proteínas ortólogas de HMG-CoA-redutase foram recuperadas (72 do banco de dados HMMER e 29 do banco de dados WormBase ParaSite). O tamanho médio das sequências de aminoácidos foi de 792 aa (375-1200 aa) e a identidade média dessas sequências de aminoácidos com a enzima ortóloga humana (888 aa) foi de 37% (20-95%), com maior conservação no domínio catalítico (587-1102 aa) da enzima. Já foi demonstrado em diferentes organismos que a sequência de aminoácidos do domínio catalítico da HMG-CoA-redutase é altamente conservada em eucariotos, mas o domínio âncora de membrana é pouco conservado. Para avaliar o grau de conservação evolutiva da HMG-CoA-redutase entre os platelmintos, nematódeos e seus respectivos hospedeiros, foi realizada uma análise filogenética. Na árvore resultante, os cordados, platelmintos e nematódeos foram separados em três clados distintos. Além disso, os platelmintos foram divididos em dois grupos monofiléticos de vermes parasitas, um correspondente aos trematódeos e outro aos cestódeos. Esses resultados são indicativos de conservação entre os grupos analisados. Para analisar as possíveis formas de interação entre HMG-CoA-redutase de *Mesocostoides corti* (McosHMGCR), *Echinococcus multilocularis* (EmHMGCR), *Echinococcus granulosus* (EgHMGCR) e *Taenia solium* (TsHMGCR) e as estatinas, foi realizada a predição da estrutura tridimensional da enzima destes parasitos por modelagem comparativa. A estrutura geral de McosHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR foi preservada em comparação com a estrutura da enzima ortóloga humana. Além disso, realizamos *docking* molecular dessas estruturas com as estatinas inibidoras (sinvastatina e fluvastatina). Observamos que em todas as estruturas dos parasitos, os resíduos Arg, Ser, Lys e Glu em posições conservadas do sítio ativo interagem com a sinvastatina ou fluvastatina. Esses resíduos presentes em McosHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR que interagem com a sinvastatina ou fluvastatina também aparecem interagindo com os inibidores no cristal hHMGCR, o que reforça a hipótese de que as HMG-CoA-redutases dos cestódeos podem ser inibidas pelas estatinas e que esses efeitos inibitórios podem ser letais para as larvas de cestódeos. Estes resultados são indicativos da conservação dos resíduos de aminoácidos e da estrutura geral. Além disso, são necessárias análises adicionais, como a avaliação *in vitro* e *in vivo* dos possíveis efeitos da sinvastatina e da fluvastatina sobre larvas de *M. corti*. Realizar ensaios *in vitro* para confirmar a inibição da HMG-CoA-redutase de *M. corti* pela sinvastatina e pela fluvastatina e identificar os mecanismos de ação da sinvastatina e da fluvastatina sobre tetratirídeos de *M. corti*.

ABSTRACT

Cestodes are parasitic flatworms capable of infecting a wide variety of mammals, including humans. Easily transmitted between hosts, they cause diseases (cestodiasis) of medical and veterinary relevance, such as echinococcosis (caused by the larval stage of *Echinococcus spp.*) and cysticercosis (caused by the larval stage of *Taenia solium*). The treatment of visceral cestodiasis usually relies on benzimidazoles and praziquantel, which are not effective against infections caused by cestodes in their larval stages. Therefore, new and more effective anthelmintics are necessary for the treatment of visceral cestodiasis. In this context, drug repositioning is an appealing strategy. In cestodes and other helminths, the mevalonate pathway is essential due to its importance in processes such as ubiquitination, prenylation, and protein glycosylation. So, enzymes from this pathway have been proposed as potential targets for the development of new anthelmintics. In this work, the potential of the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) reductase (the central enzyme of the mevalonate pathway) as a therapeutic target in cestodes is being assessed along with of HMG-CoA reductase inhibiting statins (currently used to treat hypercholesterolemia in humans) as novel anthelmintics. For the identification and definition of HMG-CoA reductase orthologues in flatworms, nematodes, and their respective hosts, orthologous HMG-CoA reductase amino acid sequences from public databases were retrieved and aligned. A total of 101 orthologous HMG-CoA reductase amino acid sequences were recovered (72 from the HMMER database and 29 from the WormBase ParaSite database). The average length of the amino acid sequences was 792 aa (375-1200 aa) and the average identity of these amino acid sequences with the human orthologous enzyme (888 aa) was 37% (20-95%), with greater conservation in the domain catalytic (587-1102 aa) of the enzyme. It has already been shown in different organisms that the amino acid sequence of the catalytic domain of HMG-CoA reductase is highly conserved in eukaryotes, but the membrane anchor domain is poorly conserved. To assess the degree of evolutionary conservation of HMG-CoA reductase among flatworms, nematodes, and their respective hosts, a phylogenetic analysis was performed. In the resulting tree, chordates, flatworms, and nematodes were separated into three distinct clades. In addition, flatworms were divided into two monophyletic groups of parasitic worms, one corresponding to trematodes and the other to cestodes. These results are indicative of conservation among the groups analyzed. To analyze the possible forms of interaction between HMG-CoA reductase from *Mesocostoides corti* (McosHMGCR), *Echinococcus multilocularis* (EmHMGCR), *Echinococcus granulosus* (EgHMGCR), and *Taenia solium* (TsHMGCR) and statins, the prediction of the three-dimensional structure of the enzyme were performed of these parasites by comparative modeling. The general structure of McosHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR, and TsHMGCR was preserved compared to the structure of the human orthologous enzyme. In addition, we performed molecular docking of these structures with inhibitory statins (simvastatin and fluvastatin). We observed that in all the structures of the parasites, the residues Arg, Ser, Lys, and Glu in conserved positions of the active site interact with simvastatin or fluvastatin. These residues present in McosHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR, and TsHMGCR that interact with simvastatin or fluvastatin also appear to interact with the inhibitors in the hHMGCR crystal, which reinforces the hypothesis that HMG-CoA reductases of cestodes can be inhibited by statins and that these inhibitory effects can be lethal to cestode larvae. These results are indicative of the conservation of amino acid residues and general structure. Furthermore, additional analyzes are needed, such as the *in vitro* and *in vivo* evaluation of the possible effects of simvastatin and fluvastatin on *M. corti* tetrathyridia. Carry out *in vitro* assays

to confirm the inhibition of *M. corti* HMG-CoA reductase by simvastatin and fluvastatin and to identify the mechanisms of action of simvastatin and fluvastatin on *M. corti* tetrathyridia.

1. Introdução

1.1. Filo Platyhelminthes

O filo Platyhelminthes é composto por uma diversidade de espécies de vermes achatados que vivem em ambientes aquáticos ou terrestres. Os platelmintos apresentam características como o corpo achatado dorsoventralmente, simetria bilateral, ausência de celoma e sistema circulatório. Além disso, em algumas espécies parasitas, ausência de epiderme e trato digestivo (Collins, 2017). O filo inclui organismos de vida livre, ecto ou endoparasitas, que possuem na extremidade anterior órgãos sensitivos e/ou de fixação. As principais classes do filo são Turbellaria, Monogenea, Trematoda e Cestoda (Neves et al., 2011).

A classe Turbellaria é composta principalmente por organismos de vida livre, comumente encontrado em ambientes de água doce, mas algumas espécies são encontradas em ambientes marinhos e terrestres. A classe Monogenea é composta principalmente por organismos ectoparasitas de peixes, mas já foram relatados casos de endoparasitismo. Todos os organismos desta classe são dependentes de ambientes aquáticos para o desenvolvimento de seus ovos e a distribuição de suas larvas (Caira; Littlewood, 2013).

As classes Trematoda e Cestoda são compostas por organismos endoparasitas de vertebrados. A Classe Trematoda constitui um grande grupo de platelmintos parasitas que se divide em duas subclasses: Aspidogastrea e Digenea. A subclasse Aspidogastrea é um grupo pequeno composto por 4 famílias, 12 gêneros e cerca de 80 espécies. Em geral, são parasitas de moluscos de água doce e marinho, e peixes cartilagosos ou ósseos, dentro desta subclasse não existem espécies de relevância médica (Toledo; Fried, 2017). Em contraste, a subclasse Digenea possui um número maior de espécies de trematódeos (com cerca de 18.000 espécies) que são parasitas de invertebrados (hospedeiros intermediários) e vertebrados (hospedeiros definitivos). Neste grupo, estão os agentes etiológicos das principais doenças causadas por trematódeos que constituem um importante problema de saúde pública, como, por exemplo, a esquistossomose, causada por espécies do gênero *Schistosoma* (Olson et al., 2003).

A classe Cestoda é composta por organismos endoparasitas obrigatórios, que no estágio adulto infectam o trato digestivo de vertebrados. Estes organismos apresentam adaptações para o parasitismo que incluem a completa ausência de um sistema digestivo, a presença de órgãos de fixação (ganchos e/ou ventosas) na parte anterior do corpo, e ciclos de vida complexos que tipicamente incluem dois ou mais hospedeiros. Além disso, o corpo em geral é alongado e constituído por segmentos (proglótides) que possuem as estruturas reprodutivas, aumentando assim a capacidade de reprodução (Kozioł, 2017).

A classe Cestoda compreende duas subclasses: Cestodaria e Eucestoda. Os parasitos pertencentes à subclasse Cestodaria não são segmentados e possuem apenas um conjunto de órgãos

reprodutivos. Por outro lado, os pertencentes à subclasse Eucestoda são segmentados em proglótides, cada uma delas contendo órgãos reprodutivos masculinos e femininos. A subclasse Eucestoda é dividida em diferentes ordens, entre elas a Tetracystida, Trypanorhynca, Pseudophyllidea e Cyclophyllidea que são universalmente reconhecidas (Littlewood; Rohde; Clough, 1999). A ordem Cyclophyllidea é subdividida em diversas famílias, sendo uma delas a família Taeniidae. Esta família é considerada de relevância, do ponto de vista médico, veterinário e econômico, por causa das doenças que causam nos seres humanos e em animais de interesse para a pecuária. Nesta família temos, por exemplo, parasitos dos gêneros *Taenia* e *Echinococcus* (Nakao et al., 2010). Outra família que também é pertencente à ordem Cyclophyllidea é a família Mesocestoididae. Esta família inclui parasitos do gênero *Mesocestoides* que infectam uma ampla gama de organismos. Neste gênero, temos o cestódeo-modelo *Mesocestoides corti* que é amplamente utilizado para o estudo de diversas características da biologia de cestódeos, como resposta a estresse, desenvolvimento e também utilizado para estudos farmacológicos (Alvarez et al., 2010; Basika et al., 2019; Camargo de Lima et al., 2020; Paludo et al., 2020).

1.2. Doenças causadas por cestódeos

Cestódeos são organismos que apresentam ciclos de vida complexos que envolvem pelo menos dois hospedeiros (um hospedeiro intermediário e um definitivo). No decorrer do seu ciclo de vida, os diferentes estágios se desenvolvem em hospedeiros distintos (Webb; Cabada, 2017). O ciclo de vida pode ser resumido da seguinte forma: o indivíduo adulto (que habita o intestino do hospedeiro definitivo) libera ovos que são excretados com as fezes para o ambiente. Quando estes ovos são ingeridos por um hospedeiro intermediário adequado, as larvas eclodem dos ovos, entram em circulação e são transportados para a musculatura ou outros órgãos. Quando estas larvas são ingeridas pelo hospedeiro definitivo, cada uma delas sofre um processo de estrobilização para formar o indivíduo adulto sexualmente maduro e reiniciando o ciclo (White; Brunetti, 2012). Em qualquer um destes estágios, os cestódeos podem causar doenças (cestodíases) em seus respectivos hospedeiros.

Os seres humanos servem como hospedeiros definitivos para os indivíduos adultos dos cestódeos *Taenia solium*, *Taenia saginata* e *Hymenolepis nana* (Dixit; Kotra, 2007; Webb; Cabada, 2017). No caso do cestódeo *H. nana*, ambas as fases de desenvolvimento (estágio larval e adulto) ocorrem no intestino do indivíduo infectado. Além disso, os humanos podem servir como hospedeiros intermediários acidentais para espécies, como *T. solium*, *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus multilocularis*. No caso do cestódeo *T. solium*, os seres humanos são hospedeiros definitivos para o verme no estágio adulto, que ocorre no intestino, mas que também pode abrigar

as larvas que formam cistos em diversos tecidos, dando origem às diferentes formas de cisticercose (Saari; Näreaho; Nikander, 2019; White; Brunetti, 2012).

As principais cestodíases são as viscerais, que são causadas pelas formas larvais (os metacestódeos) onde as de relevância são as equinococoses (causada por *Echinococcus* spp.) e as cisticercoses (causada por *T. solium*). Estas infecções viscerais são relevantes, pois estas doenças são clinicamente graves e de difícil tratamento. O impacto médico e econômico causado pelas equinococoses e as cisticercoses levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) (<http://www.who.int/en/>) a incluir estas cestodíases na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/), ressaltando a importância do desenvolvimento de estratégias de prevenção, combate e erradicação destas doenças em nível mundial.

1.2.1. Equinococoses

As equinococoses podem ocorrer de duas formas: a equinococose cística, causada por espécies crípticas pertencentes ao complexo *Echinococcus granulosus* sensu lato (Casulli; Siles-Lucas; Tamarozzi, 2019; Manterola et al., 2021); e a equinococose alveolar, causada por *E. multilocularis* (Figura 1). As duas formas da doença são de relevância médica e de saúde pública. A infecção humana com *E. granulosus* s.l. leva ao desenvolvimento de um ou mais cistos localizados com maior frequência no fígado e nos pulmões (Craig et al., 2007). O período de incubação assintomático da doença pode durar anos, até que os cistos cresçam a ponto de desencadear sinais clínicos. Segundo a OMS, metade de todos os pacientes são tratados apenas anos depois da infecção inicial com o parasito. Alguns sintomas comumente observados quando a equinococose cística ocorre no fígado são dores de cabeça, náuseas e vômitos. Se os pulmões são afetados, os sinais clínicos incluem tosse crônica, dor torácica e falta de ar. Outros sinais que possam ocorrer dependerá da localização do cisto e pressão exercida sobre os tecidos circundantes (Higueta; Brunetti; McCloskey, 2016).

A infecção humana com *E. multilocularis* leva à formação de um cisto multivesiculado que geralmente está localizado no fígado. As metástases larvais podem se formar em órgãos adjacentes ao fígado, como, por exemplo, o baço, ou em locais distantes, como os pulmões ou o cérebro (Aydin et al., 2020). O período de incubação assintomática da doença pode levar de 5 à 15 anos até o aparecimento de sinais clínicos. Alguns sintomas comumente observados quando a equinococose alveolar ocorre no fígado são dores abdominais, mal-estar, perda de peso e insuficiência hepática. Outros sintomas que possam ocorrer dependerá da localização das vesículas e a pressão exercida sobre os tecidos circundantes (Woolsey; Miller, 2021).

No que diz respeito à epidemiologia, as infecções humanas por espécies do gênero *Echinococcus* estão entre as helmintíases mais prevalentes em todo o mundo. Na América do Sul, o Cone Sul, incluindo o sul do Brasil, a Argentina, o Chile e o Uruguai, e a região andina, principalmente o Peru, são considerados regiões endêmicas ou hiperendêmicas para a equinococose cística (Daipert-Garcia et al., 2019; Deplazes et al., 2017). Segundo estimativas da OMS de 2017, estas regiões teriam uma incidência de 5.000 novos casos de equinococose cística por ano, com uma taxa de mortalidade de 2,9% (WHO, 2017).

A equinococose alveolar tem ocorrência restrita ao hemisfério norte, em regiões da China, Ásia Central, Rússia, países da Europa Continental e na América do Norte. A França, Suíça, Áustria, Ásia Central, Cazaquistão e Quirguistão são considerados regiões endêmicas para a equinococose alveolar (Wen et al., 2019). A doença tem maior incidência no planalto tibetano da China e segundo estimativas da OMS de 2017, estas regiões teriam uma incidência de 16.000 novos casos de equinococose alveolar por ano (WHO, 2017).

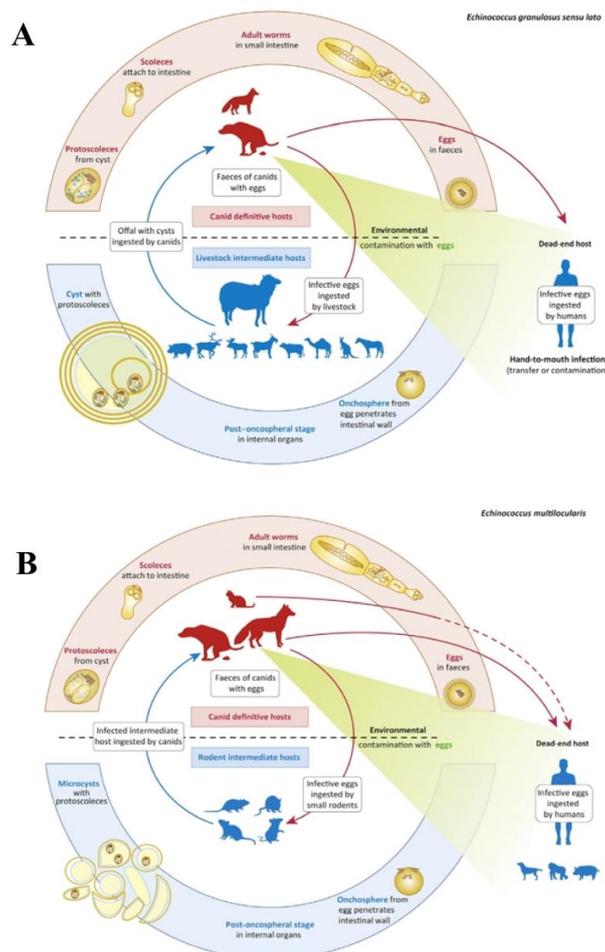


Figura 3. Representação do ciclo de vida do complexo *E. granulosus sensu lato* e *E. multilocularis*. As diferentes fases de desenvolvimento dos parasitos e seus respectivos hospedeiros (hospedeiros intermediários e hospedeiros definitivos) estão representados no ciclo. (A) Representação do ciclo de vida de *E. granulosus*. (B) Representação do ciclo de vida de *E. multilocularis*. Fonte: Casulli; Siles-Lucas; Tamarozzi, 2019.

1.2.2. Cisticercoses

As cisticercoses são causadas pelo desenvolvimento de metacestódeos de espécies do gênero *Taenia* (cisticercos) em diferentes espécies de hospedeiros intermediários, incluindo os seres humanos e animais domésticos (Figura 2). Os humanos são hospedeiros definitivos para os indivíduos adultos da espécie de *T. solium*, mas também podem abrigar a forma larval que formam cistos (cisticercos) em diversos tecidos, causando as cisticercoses (White; Brunetti, 2012). As manifestações clínicas das cisticercoses humanas dependem de características dos cisticercos (se são viáveis, metabolicamente ativos ou inativos), da resposta imune do hospedeiro, do número e da localização dos cisticercos presentes. A neurocisticercose é a apresentação clínica mais comum e grave da cisticercose humana, que ocorre quando o parasito infecta o sistema nervoso central, que está associado a casos de epilepsias (Gripper; Welburn, 2017). A transmissão do parasita para suínos (no caso de *T. solium*) e bovinos (no caso de *T. saginata*) ocorre pela excreção de ovos (ou proglótides contendo ovos) no ambiente através das fezes do hospedeiro. A ingestão destes ovos pelos suínos e bovinos através de alimentos ou água contaminados causa a cisticercose animal que ocorre com sinais clínicos inaparentes. No caso dos bovinos há o prejuízo econômico devido ao descarte da carcaça quando há presença de muitos cisticercos (Martins, 2019).

No que diz respeito à epidemiologia, as cisticercoses humanas apresentam uma distribuição cosmopolita, ocorrendo em quase todos os continentes (Dixon et al., 2020). Foi estimado que cerca de 20 a 50 milhões de indivíduos em todo o mundo tenham cisticercoses causada por *T. solium*. A neurocisticercose é uma das parasitoses mais prevalentes em seres humanos. Apesar de seu impacto global substancial, em termos de doença e carga econômica, há dados limitados sobre a distribuição e transmissão da doença (Gripper; Welburn, 2017). Segundo estimativas da OMS mais recentes, o número total de indivíduos com neurocisticercose no mundo, incluindo casos sintomáticos e assintomáticos, seria da ordem de 2,5 a 8,3 milhões (WHO, 2017). As cisticercoses humanas afetam principalmente países em desenvolvimento na América Latina, na África Subsaariana e no sul e no sudeste da Ásia. Além disso, estas regiões juntamente a Índia, China e Nepal, são consideradas regiões endêmicas para a neurocisticercose (Gripper; Welburn, 2017).

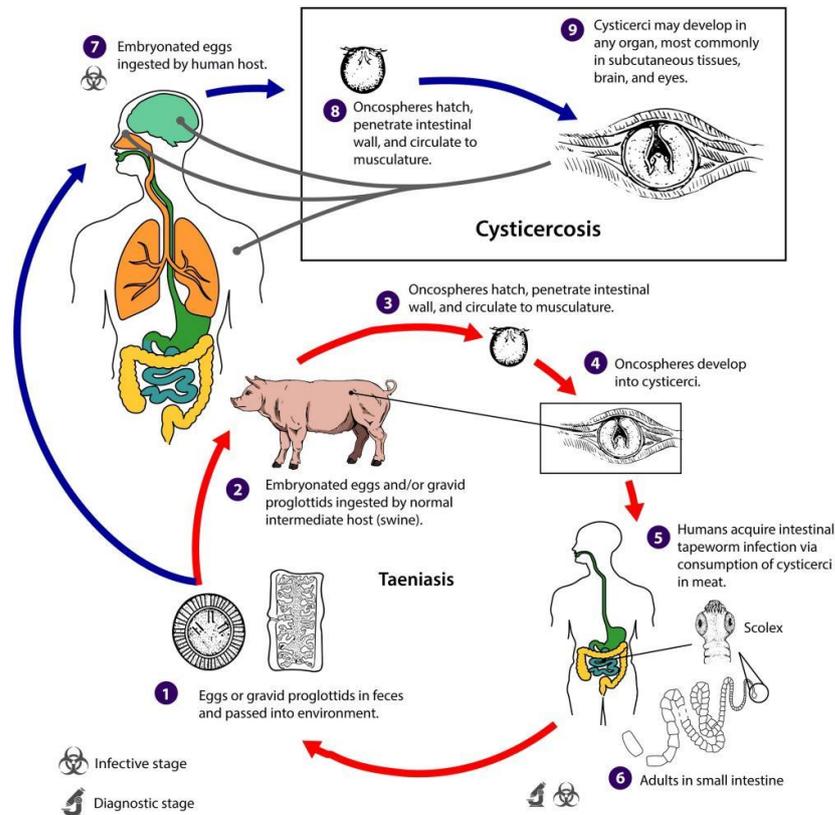


Figura 4. Representação esquemática do ciclo de vida de *T. solium*. As diferentes fases do desenvolvimento do parasito estão representadas de 1 a 6, e em 7 está representado a infecção em humanos pela forma larval. Fonte: <https://www.cdc.gov/dpdx/cysticercosis/index.html>.

1.3. *M. corti* como organismo-modelo para estudos da biologia de cestódeos

Estudos que envolvem cestódeos de relevância médica e veterinária, como os da família Taeniidae (por exemplo: gêneros *Echinococcus* e *Taenia*), são dificultados pela ausência de protocolos bem estabelecidos para a manutenção destes organismos em condições laboratoriais. Desde forma, é necessária a coleta do material a campo ou em matadouros (Hemphill, 2010; Lustigman et al., 2012). Neste contexto, a disponibilidade de um organismo modelo como *M. corti* permite o estudo de aspectos básicos sobre a biologia de cestódeos, pois pode ser facilmente mantido *in vivo* e *in vitro*.

O ciclo de vida de *M. corti* (Figura 3) tem dois hospedeiros intermediários e um hospedeiro definitivo (Mehlhorn; Aspöck, 2008). O primeiro hospedeiro intermediário é um artrópode coprófago e o segundo hospedeiro intermediário pode ser mamíferos, aves, anfíbios ou répteis. No seu ciclo de vida, a oncosfera, é ingerida pelo primeiro hospedeiro intermediário. Após a eclosão, o embrião hexacanto penetra na cavidade corpórea deste hospedeiro, onde se desenvolve no primeiro estágio larval. O cisticercoide quando ingerido pelo segundo hospedeiro intermediário, se

transforma no segundo estágio larval. O tetratrídeo então se reproduz de forma assexuada no segundo hospedeiro intermediário. Quando ingerido pelo hospedeiro definitivo sofre o processo de estrobilização para formar o verme adulto, sexualmente diferenciado e segmentado (proglótides), o que é uma característica típica dos cestódeos.

Os tetratrídeos podem ser facilmente mantidos *in vivo* por uma série de passagens em hospedeiros experimentais como camundongos e ratos, onde se reproduzem assexuadamente. O seu processo de maturação na forma adulta pode ser induzido e seguido *in vitro* (Markoski et al., 2003). Utilizando *M. corti* como organismo-modelo, nosso grupo tem buscado compreender aspectos relacionados à biologia de cestódeos, principalmente aqueles relacionados com a expressão gênica diferencial durante o desenvolvimento (Basika et al., 2019).

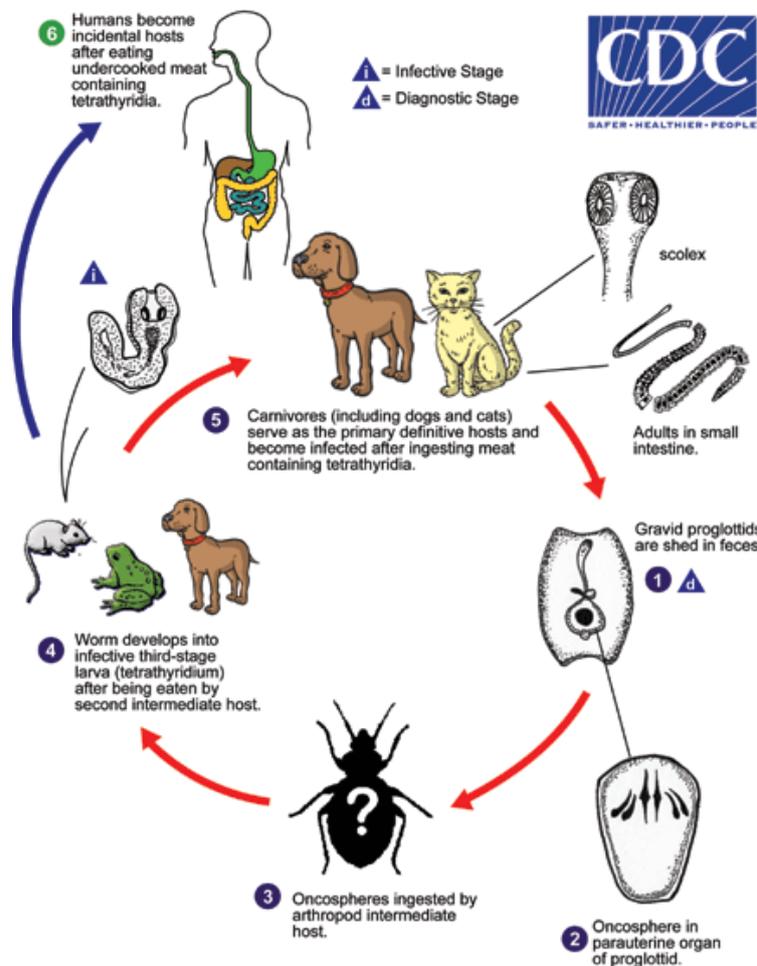


Figura 3. Representação esquemática do ciclo de vida de *M. corti*. As diferentes fases do desenvolvimento do parasito estão representadas de 1 a 5, e em 6 está representado a infecção acidental em humanos. Fonte: <https://www.cdc.gov/dpdx/mesocestoidiasis/index.html>.

1.4. Tratamento de cestodíases e reposicionamento de fármacos

As cestodíases intestinais são de fácil tratamento em comparação às cestodíases viscerais. Usualmente os indivíduos adultos são eficientemente eliminados dos hospedeiros intermediários humanos ou animais domésticos por tratamentos com anti-helmínticos como o praziquantel e a niclosamida (Gilman et al., 2012; Wang et al., 2021). Por outro lado, as cestodíases viscerais, causadas pelas formas larvais dos cestódeos, são clinicamente mais graves e de difícil tratamento. A natureza cística ou vesicular dos metacestódeos e a localização no interior das vísceras ou tecidos são fatores que complicam as estratégias terapêuticas. Estes fatores dificultam e tornam arriscada a remoção cirúrgica dos parasitos, além de dificultarem o acesso dos fármacos utilizados no tratamento quimioterápico.

No caso de equinococoses viscerais, o diagnóstico das infecções causadas pelos metacestódeos é difícil devido à lentidão de crescimento dos cistos, porém o diagnóstico pode ser feito por radiografia, tomografia computadorizada ou ultrassonografia abdominal e sua confirmação laboratorial depende de testes sorológicos (Kern et al., 2017). Existem três formas de tratamento para a equinococose cística: i) tratamento percutâneo dos cistos pela técnica de PAIR (punção, aspiração, injeção, reaspiração); ii) cirurgia; e iii) tratamento quimioterápico, que baseiam-se quase que exclusivamente na administração via oral de benzimidazóis, como albendazol e mebendazol (Woolsey; Miller, 2021).

No caso das cisticercoses humana, o tratamento primário baseia-se na administração de fármacos como o albendazol e outros benzimidazóis, como os utilizados para as equinococoses, e/ou o praziquantel. O tratamento cirúrgico geralmente é dispensável nas cisticercoses e em muitos casos de neurocisticercose, quando o tratamento quimioterápico é efetivo. Entretanto o tratamento cirúrgico é recomendado em alguns casos de neurocisticercose, conforme a localização dos cistos e os sintomas clínicos (White; Garcia, 2018). A prevenção às doenças causadas por cestódeos podem ser feitas por desparasitação periódica nos animais (principalmente cães), melhoria de higiene no abate de gado e campanhas de educação pública (Woolsey; Miller, 2021).

Tratamentos efetivos contra as cestodíases ainda não estão disponíveis. A principal forma de tratamento é o uso de derivados de benzimidazóis (como triclabendazol, albendazol e o mebendazol) e o praziquantel. Estes fármacos, contudo apresentam várias limitações quanto à efetividade do tratamento e restrições de aplicação associadas a efeitos colaterais. Esta limitação de opções pode favorecer a seleção de parasitos com resistência aos poucos fármacos atualmente disponíveis (Claerebout et al., 2020; Haby et al., 2020; Ramianrasoa et al., 2020; Sangster; Cowling; Woodgate, 2018). Assim, existe a necessidade de identificar novas formas terapêuticas mais eficientes para o tratamento das cestodíases. Neste contexto, a estratégia de reposicionamento de fármacos se torna uma estratégia interessante.

O termo reposicionamento de fármaco ou reaproveitamento de fármaco é geralmente aplicado para a descoberta de novos usos terapêuticos para fármacos que já são comercializados e usados clinicamente (Muthyala, 2012). O reposicionamento de fármacos tornou-se popular nos últimos anos, principalmente pelo fato de que o processo de pesquisa e o desenvolvimento de um novo fármaco é laborioso, exaustivo e caro, podendo levar de 10 a 17 anos, desde a ideia até o medicamento comercializado. Por outro lado, o reposicionamento de fármacos oferece a possibilidade de reduzir o tempo, sendo um processo de 3 a 12 anos, e significativa diminuição nos custos (Ashburn; Thor, 2004).

Com base na estratégia de reposicionamento de fármacos, têm surgido estudos genômicos nos últimos anos com o objetivo de identificar novos potenciais alvos terapêuticos em vermes parasitas. Estes estudos demonstraram a conservação de vias metabólicas, módulos metabólicos e vias bioquímicas em platelmintos e nematódeos parasitas que podem fornecer potenciais alvos terapêuticos para novos fármacos ou para o reposicionamento de fármacos (Coghlan et al., 2019). Além disso, estudos aplicados vêm utilizando esta estratégia para o tratamento de helmintíases, como, por exemplo, a artemisinina e seus derivados. Estes fármacos inicialmente utilizados no tratamento da malária estão sendo reposicionados como potenciais anti-helmínticos, depois de já terem sido também testados como antineoplásicos e como antibacterianos (Lam et al., 2018).

No caso de cestodíases, fármacos como a buparvaquona (antiteilérico), a mefloquina (antimalárico) e a atovaquona (usada para tratamento de pneumocistose, toxoplasmose e malária) mostraram atividade contra metacestódeos de *E. multilocularis in vitro* e *in vivo* (Lundström-Stadelmann; Rufener; Hemphill, 2020; Rufener et al., 2018). De forma geral, estes estudos ainda são preliminares e há no mercado muitos fármacos antiparasitários, antineoplásicos ou de outra natureza cujo potencial como anti-helmínticos precisa ser avaliado quanto a seus alvos e efeitos (Panic et al., 2014).

1.5. HMG-CoA-redutase e as estatinas

A 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase é a enzima responsável pela conversão do composto HMG-CoA em mevalonato. Existem duas classes distintas da enzima HMG-CoA-redutase: a classe I consiste em enzimas eucarióticas e na maioria das arqueas, enquanto a classe II consiste em enzimas procarióticas (Figura 4) (Friesen; Rodwell, 2004).

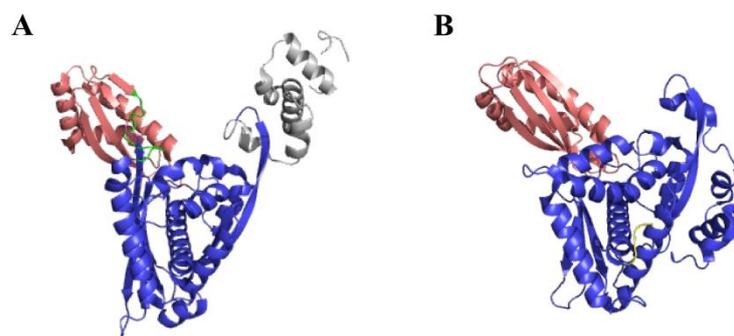


Figura 4. Representação das HMG-CoA-redutases de classe I e classe II. (A) Representação do monômero da HMG-CoA-redutase (classe I) de *Homo sapiens*. Domínio L representado em azul. Domínio S representado em rosa e domínio N representado em cinza. (B) Representação do monômero da HMG-CoA-redutase (classe II) de *Pseudomonas mevalonii*. Domínio L representado em azul e domínio S representado em rosa.

As HMG-CoA-redutases de classe I catalisam a síntese de mevalonato dependente de NADP a partir da HMG-CoA. Em vertebrados, a HMG-CoA-redutase é a principal enzima na biossíntese de colesterol e outros isoprenoides, enquanto nas plantas, o mevalonato é o precursor de todos os compostos isoprenoides. Em arqueas, a HMG-CoA-redutase é uma enzima citoplasmática envolvida na biossíntese de cadeias laterais dos isoprenóides dos lipídeos (Hoshino; Gaucher, 2018; Kirby; Keasling, 2009; Liao et al., 2016). As HMG-CoA-redutases de classe I consistem em um domínio de membrana N-terminal e uma região catalítica C-terminal. A região catalítica pode ser subdividida em três domínios: um domínio N, um domínio L e um domínio S. O domínio L se liga ao substrato, enquanto o domínio S se liga ao NADP (Vögeli et al., 2019).

As HMG-CoA-redutases de classe II catalisam a reação reversa de enzimas da classe I, ou seja, a síntese de HMG-CoA dependente de NAD a partir de mevalonato e CoA. Algumas bactérias, como por exemplo, *Pseudomonas mevalonii*, podem usar o mevalonato como única fonte de carbono. As enzimas de classe II não possuem um domínio de membrana e sua região catalítica esta estruturalmente relacionada à das enzimas de classe I, mas consiste em apenas dois domínios: um domínio L e um domínio S. Bem como acontece com as enzimas de classe I, o domínio L liga-se ao substrato, enquanto o domínio S se liga a NAD (Steussy et al., 2013).

A HMG-CoA-redutase é a principal enzima da via do mevalonato. A via do mevalonato (Figura 5) é essencial em eucariotos pela sua importância em processos como a biossíntese de colesterol e outros isoprenoides (Rauthan; Pilon, 2011). Nos metazoários, incluindo os cestódeos, a via do mevalonato esta presente, mas sem o ramo que leva a síntese de colesterol, fazendo-se necessário a captação desta molécula do hospedeiro. Desta forma, a HMG-CoA-redutase de cestódeos surge como potencial alvo terapêutico (Coghlan et al., 2019), assim como as outras enzimas da via.

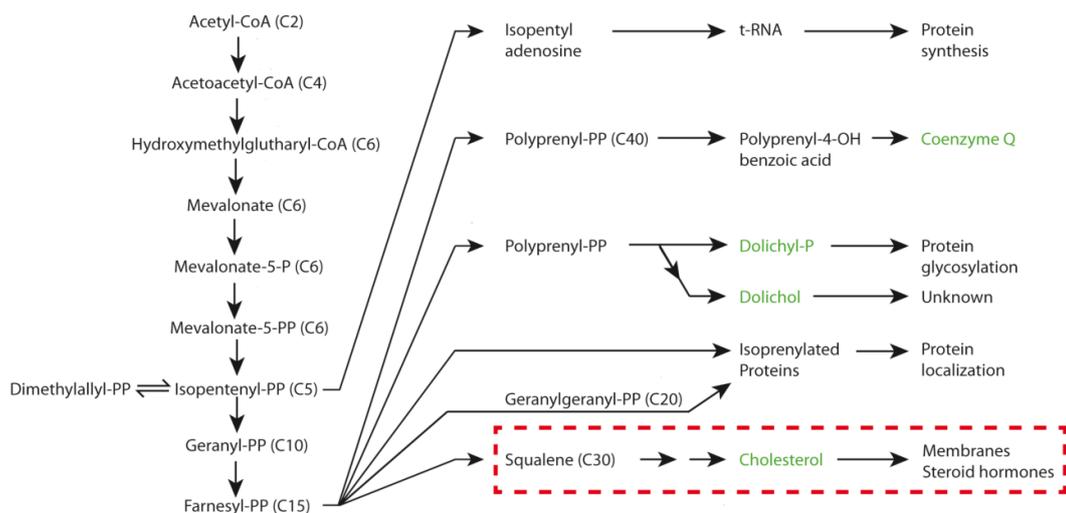


Figura 5. Visão geral da via do mevalonato. Retângulo pontilhado em vermelho, esta representando o ramo da via que leva a síntese de colesterol, ausente em cestódeos. Fonte: Rauthan; Pilon, 2011.

A HMG-CoA-redutase é alvo de um conjunto de fármacos denominadas estatinas. As estatinas atualmente disponíveis comercialmente são a atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina e a sinvastatina (Figura 6). As estatinas naturais que derivam de fermentação fúngica são a lovastatina (isolado de *Aspergillus terreus*), pravastatina (isolado de *Penicillium citinum*) e a sinvastatina (isolado de *A. terreus*). As estatinas totalmente sintéticas são a atorvastatina, fluvastatina, pitavastatina e rosuvastatina (Schachter, 2005). A ação de inibição da HMG-CoA-redutase promovida pelas estatinas deve-se a uma similaridade na sua estrutura com o substrato HMG-CoA. Assim, as estatinas se ligam de maneira reversível e competitiva do que o substrato natural à enzima HMG-CoA-redutase, impedindo a biossíntese de colesterol (Endo, 2004; Solomon; Freeman, 2008).

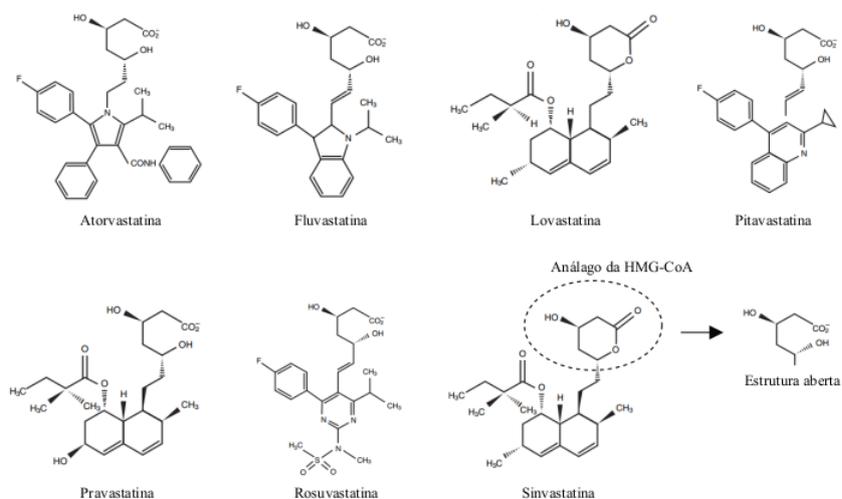


Figura 6. Representação da estrutura química das estatinas. A estrutura análoga das estatinas ao substrato HMG-CoA esta destacada pela elipse pontilhada. A representação da estrutura análoga das estatinas à HMG-CoA também esta representada aberta. Fonte: Endo, 2004.

As estatinas são utilizadas para controlar os níveis elevados de colesterol no sangue (hipercolesterolemia) em humanos. Estes fármacos também são utilizados para prevenir doenças cardiovasculares, e outros possíveis usos terapêuticos incluem o tratamento de doenças inflamatórias, imunológicas e como fármacos anticancerígenos (Demierre et al., 2005; Karlic; Varga, 2017; Liao; Laufs, 2005). O uso das estatinas como fármacos antiparasitários já foram testados *in vitro* nos protozoários *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum* e *Leishmania donovani* (Coppens; Courtoy, 1996; Parquet et al., 2010; Peres et al., 2018). No platelminto *Schistosoma mansoni* (classe Trematoda), já foi demonstrado o potencial anti-helmíntico das estatinas em cultivos *in vitro* de diferentes estágios de *S. mansoni*, como equistossômulos e adultos, que infectam o hospedeiro mamífero (Rojo-Arreola et al., 2014). No entanto, nas formas larvais de cestódeos o efeito das estatinas na sobrevivência dos parasitos ainda não foi avaliado. Assim, o uso de estatinas é uma forma não só de estudar a prospecção de novas drogas anti-helmínticas, mas também o mecanismo de metabolismo e transporte de colesterol aumentando assim o conhecimento da biologia básica destes organismos.

2. Justificativas

As cestodíases causadas pelas formas larvais de cestódeos causam infecções com impacto na saúde pública humana e animal. O tratamento destas cestodíases como as equinococoses e as cisticercoses, além de limitado, não é efetivo, fazendo-se necessário buscar novas formas terapêuticas. Assim, a estratégia de reposicionamento de fármacos na busca por novas formas de tratamento para as cestodíases viscerais torna-se interessante, pois esta estratégia é mais rápida e econômica do que os métodos tradicionais (desenvolvimento de novos fármacos).

Em cestódeos, a via do mevalonato é essencial para processos como a ubiquitinação e a prenilação de proteínas, embora os cestódeos não possuam o ramo que leva a síntese *de novo* de colesterol. Desta forma, as enzimas da via do mevalonato foram propostas como potenciais alvos para o reposicionamento de fármacos como novos anti-helmínticos. Neste contexto, temos a enzima HMG-CoA-redutase (enzima central da via do mevalonato) como possível alvo terapêutico em cestódeos.

As estatinas são os fármacos inibidores da HMG-CoA-redutase e atualmente são utilizadas no tratamento da hipercolesterolemia em humanos. Este conjunto de fármacos aprovados e disponíveis comercialmente, cujo alvo é parte central da via de transporte e metabolismo associado ao colesterol, poderá interferir na viabilidade de cestódeos larvais, é uma estratégia promissora. Além disso, contribuirá para o melhor entendimento de questões dos mecanismos fisiológicos básicos do metabolismo de colesterol dos parasitos.

O uso de abordagens computacionais como modelagem comparativa, *docking* molecular e reconstrução filogenética, para avaliar a HMG-CoA-redutase como potencial alvo terapêutico em cestódeos poderão prover informações importantes a respeito da enzima destes organismos. Estes dados podem ajudar na predição de aspectos estruturais das HMG-CoA-redutases de cestódeos e os tipos de interações preditas que estas enzimas realizam com seus inibidores, além de questões relacionadas com a conservação da enzima alvo dentro de diferentes helmintos parasitas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar o reposicionamento de estatinas inibidoras da enzima HMG-CoA-redutase como anti-helmínticos.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Avaliar o grau de conservação evolutiva da enzima HMG-CoA-redutase entre helmintos parasitas e seus respectivos hospedeiros.

3.2.2. Modelar e comparar as estruturas tridimensionais da HMG-CoA-redutase do cestódeo-modelo *M. corti* e dos cestódeos de relevância médica e veterinária *E. multilocularis*, *E. granulosus* e *T. solium*.

3.2.3. Analisar *in silico* as possíveis formas de interação dos inibidores sinvastatina e fluvastatina com as HMG-CoA-redutases de *M. corti*, *E. multilocularis*, *E. granulosus* e *T. solium*.

4. Materiais e Métodos

4.1. Identificação de ortólogos da HMG-CoA-redutase em helmintos parasitas e seus respectivos hospedeiros

Para a identificação e definição das sequências de aminoácidos de proteínas ortólogas da HMG-CoA-redutase em helmintos parasitas e seus respectivos hospedeiros, e de nematódeos parasitas que causam doenças gastrointestinais, foram realizadas buscas em diferentes bancos de dados, usando a sequência de aminoácidos da HMG-CoA-redutase humana (Uniprot ID: P04035) como referência. As buscas foram realizadas por meio do perfil Markov models (perfil HMMs) do pacote de ferramentas HMMER (Potter et al., 2018), com a utilização de um *e-value* de 0,01. As buscas foram restritas por taxonomia, sendo selecionadas apenas sequências do reino Metazoa.

Foram também realizadas buscas no banco de dados específico para parasitos WormBase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>) também utilizando a sequência de aminoácidos da HMG-CoA-redutase humana (Uniprot ID: P04035) como referência. Estas buscas foram realizadas nos genomas de platelmintos e nematódeos disponíveis na plataforma utilizando a

ferramenta BLAST. Foram mantidos os parâmetros *default* da ferramenta (matriz: BLOSUM62 e *e-value*: 0,01).

A anotação das sequências de aminoácidos de platelmintos e nematódeos parasitas foi verificada. Primeiro, as sequências de mRNA de *M. corti* e *E. multilocularis* tiveram a qualidade aferida com base em comparações com dados de RNA-seq disponíveis. Segundo, as sequências de DNA do gene da HMG-CoA-redutase de platelmintos e nematódeos (Howe et al., 2017) foram traduzidas nas três fases de leitura utilizando a ferramenta ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). E por último, para garantir que as sequências de aminoácidos estavam completas foram realizados alinhamentos das sequências de aminoácidos traduzidas de platelmintos e nematódeos com as sequências de aminoácidos de *M. corti* e *E. multilocularis* utilizando o clustalW (Larkin et al., 2007). Após verificação das sequências de aminoácidos obtidas foi montada uma matriz de identidade e similaridade com a ferramenta MatGAT (Campanella; Bitincka; Smalley, 2003) para verificação do grau de conservação em relação à sequência da HMG-CoA-redutase humana. Para definição de proteínas ortólogas, foram estabelecidos os parâmetros mínimos de 20% de identidade e 28% de similaridade.

4.2. Análise filogenética da HMG-CoA-redutase em helmintos parasitas e seus respectivos hospedeiros

As análises filogenéticas foram realizadas usando o método probabilístico de Máxima Verossimilhança (ML). As sequências de aminoácidos foram alinhadas usando o clustalW (Larkin et al., 2007) e as análises evolutivas foram conduzidas no MEGA X v10.1.8 (Kumar et al., 2018), utilizando o modelo de substituição JTT+G (definido pela ferramenta Find Best DNA/Protein Models), com 5 categorias gama. A árvore consensual foi inferida com 2000 réplicas.

4.3. Predições da estrutura tridimensional da HMG-CoA-redutase de cestódeos

A modelagem comparativa da HMG-CoA-redutase de *M. corti* (McosHMGCR), *E. multilocularis* (EmHMGCR), *E. granulosus* (EgHMGCR) e *T. solium* (TsHMGCR) foram realizadas utilizando a ferramenta Modeller v10.0 e o SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>).

As sequências-alvo foram utilizadas como *input* para a ferramenta HHpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>) onde foram realizadas as buscas por estruturas para servirem como moldes. Para a escolha dos moldes foram considerados os parâmetros de função, cobertura, identidade e resolução do molde ($< 3 \text{ \AA}$). Posteriormente, foram realizados os alinhamentos (formato PAIR, *input* para o Modeller) das sequências de aminoácidos dos moldes com as a sequências-alvo. Por fim, os modelos foram construídos utilizando a ferramenta Modeller.

O servidor do SWISS-MODEL também foi utilizado para a modelagem comparativa de McosHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR. As sequências-alvos foram utilizadas como *input* no servidor para realizar a busca por moldes. Para a escolha dos moldes foram considerados os parâmetros de GMQE (Estimativa global de qualidade do modelo, do inglês *Global Model Quality Estimation*), função, cobertura, identidade e resolução do molde ($< 3 \text{ \AA}$). Depois da definição dos moldes, realizamos o alinhamento das sequências dos moldes com as sequências-alvo. Estes alinhamentos foram utilizados para a construção dos modelos no SWISS-MODEL.

Os modelos construídos no Modeller e no SWISS-MODEL tiveram suas qualidades avaliadas utilizando as ferramentas PROCHECK (Morris et al., 1992), Verify-3D (Bowie; Lüthy; Eisenberg, 1991; Bowie; Lüthy; Eisenberg, 1992), ERRAT (Colovos; Yeates, 1993), disponíveis no servidor do SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>), e a ferramenta QMEAN, disponível no servidor do SWISS-MODEL. O melhor modelo para cada sequência-alvo (McosHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR) foi escolhido com base nas avaliações destas ferramentas.

4.4. Predição dos modos de interação da sinvastatina ou da fluvastatina com as HMG-CoA-redutases de cestódeos

Os experimentos de *docking* molecular foram realizados no servidor do DockThor (<https://dockthor.lncc.br/v2/>). Para os experimentos de *docking* molecular foram utilizados a estrutura predita da HMG-CoA-redutase de *M. corti* (McosHMGCR), sinvastatina ou fluvastatina e o cofator adenosina-5-difosfato (ADP). As seguintes coordenadas da caixa foram utilizadas: coordenadas do centro da caixa $x = -30$, $y = 30$ e $z = 16$ e o tamanho da caixa $x = 22$, $y = 22$ e $z = 22$. Para os experimentos de *docking* molecular com a estrutura predita de *E. multilocularis* (EmHMGCR), também foi utilizado a sinvastatina ou fluvastatina, e o cofator ADP. As seguintes coordenadas da caixa foram utilizadas: coordenadas do centro da caixa $x = 63$, $y = -18$ e $z = 35$ e o tamanho da caixa $x = 22$, $y = 22$ e $z = 22$. Por sua vez, os experimentos de *docking* molecular com a estrutura predita de *E. granulosus* (EgHMGCR), também utilizamos a sinvastatina ou fluvastatina, e o cofator ADP. As seguintes coordenadas da caixa foram utilizadas: coordenadas do centro da caixa $x = 62.5$, $y = -18.4$ e $z = 36.5$ e o tamanho da caixa $x = 22$, $y = 22$ e $z = 22$. Por fim, os experimentos de *docking* molecular foram realizados com a estrutura predita de *T. solium* (TsHMGCR), sinvastatina ou fluvastatina, e o cofator ADP. As seguintes coordenadas da caixa foram utilizadas: coordenadas do centro da caixa $x = 49.5$, $y = 15$ e $z = 17$ e o tamanho da caixa $x = 22$, $y = 22$ e $z = 22$.

5. Resultados

5.1. Recuperação e definição das sequências de HMG-CoA-redutase de helmintos e nematódeos parasitas e seus respectivos hospedeiros

Para a identificação e definição das sequências de aminoácidos de proteínas ortólogas da HMG-CoA-redutase em helmintos e nematódeos parasitas e seus respectivos hospedeiros diferentes bancos de dados foram explorados. Nas buscas realizadas pelo HMMER foram recuperadas 72 sequências de aminoácidos de proteínas ortólogas da HMG-CoA-redutase humana, sendo 47 sequências de helmintos parasitas, 19 sequências de seus respectivos hospedeiros, e 6 sequências de nematódeos. Na busca realizada pelo WormBase ParaSite foram recuperadas 29 sequências de aminoácidos de proteínas ortólogas da HMG-CoA-redutase, sendo 25 de helmintos parasitas e 4 sequências de nematódeos. Estes resultados estão concatenados na Tabela 1. O tamanho médio das sequências de aminoácidos das HMG-CoA-redutases foi de 792 aa (375-1.200 aa) e a média de identidade destas sequências de aminoácidos em relação à enzima ortóloga humana (888 aa) foi de 37% (20-95%), com maior conservação no domínio catalítico (resíduos 587-1102) da enzima (Figura Suplementar 1).

Pode-se observar que entre os parasitas a sequência de aminoácidos da *T. saginata* é a com o menor grau de conservação (20% de identidade e 34% de similaridade). Por outro lado, a sequência de aminoácidos com o maior grau de conservação foi a de *Hymenolepis diminuta* (31% de identidade e 50% de similaridade). Dentro dos cestódeos selecionados, em específico para *M. corti*, os valores foram 29% de identidade e 44% de similaridade. Entre as espécies do gênero *Echinococcus* os valores foram de 27% de identidade e 40% de similaridade (*E. multilocularis*) e 27% de identidade e 38% de similaridade (*E. granulosus*). Por sua vez, para *T. solium* os valores foram 29% de identidade e 45% de similaridade. Estes resultados iniciais indicam que as sequências de aminoácidos da HMG-CoA-redutase são relativamente conservadas em relação à enzima humana.

Tabela 1. Conservação relativa das seqüências deduzidas de aminoácidos da HMG-CoA-redutase em diferentes parasitas e seus respectivos hospedeiros. Lista de seqüências da HMG-CoA-redutase em helmintos parasitas (cinza escuro) e seus respectivos hospedeiros (branco) e os nematódeos (cinza). Os parâmetros relativos de conservação relativa são em relação à enzima humana (888 aa).

| Espécies | Gene ID | Identidade (%) | Similaridade (%) | Cobertura (%) | Tamanho (aa) |
|------------------------------------|--|----------------|------------------|---------------|--------------|
| <i>Bos taurus</i> | HMDH_BOVIN* | 95,5 | 97,1 | 98,4 | 888 |
| <i>Ovis aries</i> | W5Q5I1_SHEEP* | 95,6 | 97,2 | 98,4 | 888 |
| <i>Sus scrofa</i> | HMDH_PIG* | 94,8 | 96,7 | 97,8 | 885 |
| <i>Clonorchis sinensis</i> | Csin105906** | 30,4 | 47,0 | 57,9 | 800 |
| <i>Echinococcus granulosus</i> | EgrG_000630800** | 27,1 | 38,4 | 44,3 | 560 |
| <i>Echinococcus multilocularis</i> | EmuJ_000630800** | 27,8 | 40,9 | 46,9 | 596 |
| <i>Fasciola hepatica</i> | maker-scaffold10x_357_pilon-augustus-gene-0.37** | 30,7 | 48,2 | 63,5 | 929 |
| <i>Hymenolepis diminuta</i> | A0A564Y764_HYMDI* | 31,9 | 50,2 | 59,4 | 835 |
| <i>Hymenolepis microstoma</i> | HmN_000619400** | 31,4 | 47,1 | 55,5 | 737 |
| <i>Mesocestoides corti</i> | MCU_000834** | 29,1 | 44,9 | 63,6 | 887 |
| <i>Opisthorchis felineus</i> | CRM22_002740** | 30,5 | 48,7 | 63,9 | 890 |
| <i>Opisthorchis viverrini</i> | T265_09380** | 30,5 | 48,1 | 64,4 | 940 |
| <i>Schistosoma bovis</i> | DC041_0002341** | 29,9 | 47,0 | 55,4 | 778 |
| <i>Schistosoma haematobium</i> | MS3_0013841** | 27,3 | 43,4 | 64,9 | 1075 |
| <i>Schistosoma japonicum</i> | EWB00_006340** | 31,7 | 49,7 | 66,8 | 952 |
| <i>Schistosoma mansoni</i> | Smp_138590** | 30,7 | 48,7 | 65,7 | 948 |
| <i>Schistosoma margrebowiei</i> | SMRZ_0000754801** | 21,1 | 28,2 | 31,9 | 375 |
| <i>Taenia asiatica</i> | TASK_0000700001** | 29,7 | 46,5 | 55,1 | 742 |
| <i>Taenia saginata</i> | TsAs00011g02659** | 20,5 | 34,6 | 55,5 | 1200 |
| <i>Taenia solium</i> | TsM_000492100** | 29,9 | 45,8 | 54,7 | 733 |
| <i>Ascaris lumbricoides</i> | ALUE_0001715601** | 27,5 | 43,7 | 46,7 | 697 |
| <i>Ascaris lumbricoides</i> | EVEC_0000464501** | 27,9 | 40,1 | 45,8 | 548 |
| <i>Enterobius vermicularis</i> | NECAME_06176** | 27,1 | 38,4 | 43,3 | 581 |
| <i>Necator americanus</i> | SSTP_0000817200** | 27,2 | 40,7 | 43,8 | 561 |

*Uniprot ID.

**WormBase ParaSite ID.

5.2. Avaliação da conservação evolutiva das sequências de aminoácidos da HMG-CoA-redutase de helmintos parasitas e seus respectivos hospedeiros

Para a reconstrução filogenética das sequências de aminoácidos das HMG-CoA-redutases uma análise filogenética foi realizada com 17 sequências de aminoácidos de helmintos parasitas, compreendendo sequências de 9 espécies de trematódeos (*Clonorchis sinensis*, *Fasciola hepatica*, *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini*, *Schistosoma bovis*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma margrebowiei*) e 8 sequências de cestódeos (*E. granulosus*, *E. multilocularis*, *H. diminuta*, *Hymenolepis microstoma*, *M. corti*, *Taenia asiatica*, *T. saginata* e *T. solium*). Um grupo externo de 8 sequências foi utilizado na análise, compreendendo 4 espécies de nematódeos que causam doenças gastrointestinais (*Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Necator americanus* e *Strongyloides stercoralis*) e as espécies hospedeiras dos helmintos analisados (*Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Ovis aries* e *Sus scrofa*). A análise filogenética resultou em uma árvore filogenética que esta representada na figura 7. A árvore filogenética revelou três clados distintos: cordados, platelmintos e nematódeos. Já os platelmintos foram divididos em dois grupos monofiléticos de vermes parasitas, um correspondendo a trematódeos e o outro a cestódeos. A distinção dos organismos analisados demonstra que as espécies intimamente relacionadas se agrupam no mesmo ramo. A análise evolutiva do gene da HMG-CoA-redutase indica que este gene diversificou em paralelo com a divisão taxonômica. Além disso, a análise filogenética indica que existe uma relação entre as espécies de platelmintos, nematódeos e cordados.

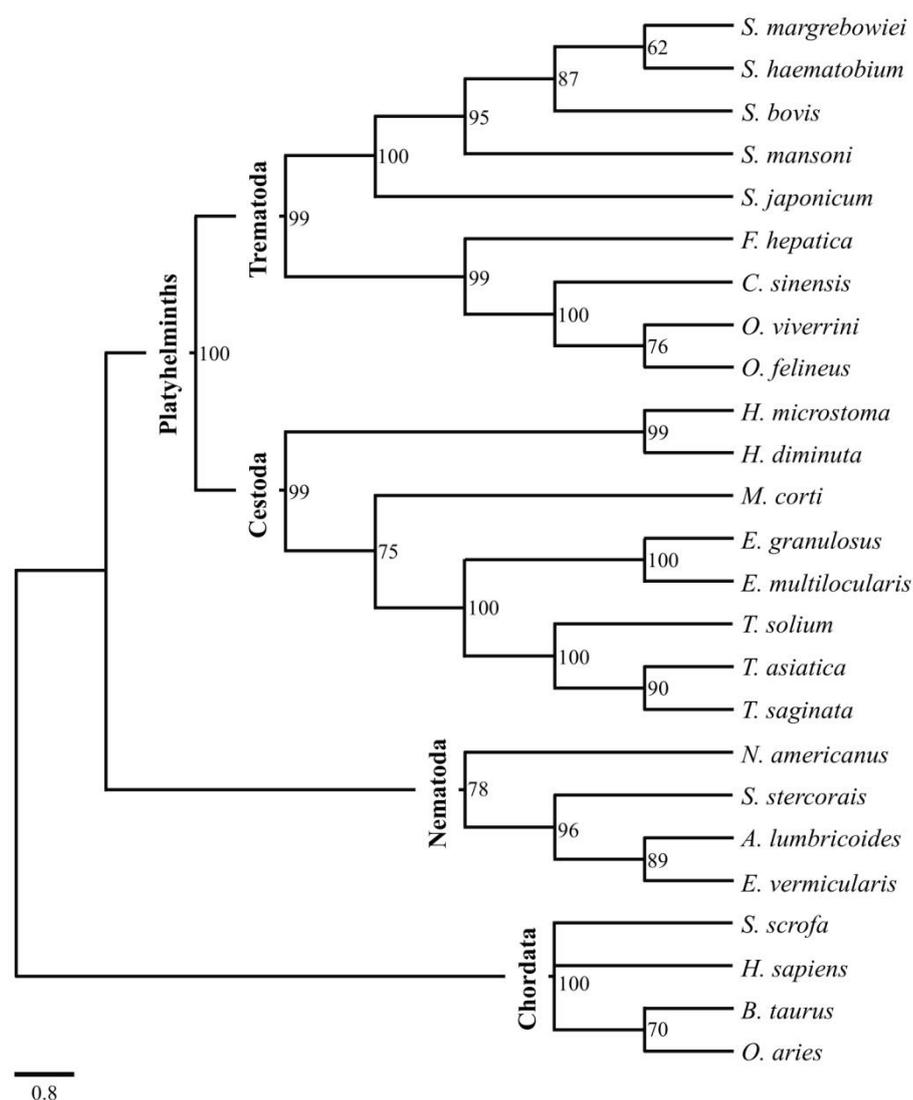


Figura 5. Árvore filogenética da HMG-CoA-redutase de helmintos parasitas e seus respectivos hospedeiros. Árvore filogenética mostrando a conservação relativa da HMG-CoA-redutase em diferentes helmintos parasitas. A análise envolveu 25 sequências de aminoácidos, sendo 17 sequências de aminoácidos de helmintos parasitas, 4 sequências de aminoácidos de seus hospedeiros e 4 sequências de aminoácidos de nematódeos (grupo externo). A árvore filogenética foi obtida usando o método de máxima verossimilhança baseado no modelo baseado em matriz JTT. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons agrupados no teste de *bootstrap* (2000 réplicas) são mostrados ao lado dos ramos.

5.3. Avaliação da conservação evolutiva de estruturas das HMG-CoA-redutases dos cestódeos *M. corti*, *E. multilocularis*, *E. granulosus* e *T. solium*

Para avaliação das possíveis formas de interação da HMG-CoA-redutase com os fármacos sinvastatina e fluvastatina foi realizada a predição da estrutura tridimensional da enzima alvo. Foram preditas as estruturas da enzima do cestódeo-modelo *M. corti* (Figura 8A) e dos cestódeos de relevância médica e veterinária *E. multilocularis* (Figura 8B), *E. granulosus* (Figura 8C) e *T. solium* (Figura 8D). Para cada uma destas espécies foram construídos pelo menos 12 modelos.

Estes modelos tiveram suas qualidades avaliadas e os melhores modelos foram escolhidos para as etapas posteriores. Os resultados das avaliações são apresentados nos materiais suplementares.

De forma geral, o monômero contém uma estrutura composta de três domínios: um domínio helicoidal N-terminal chamado domínio N (rosa), um domínio L (azul) e um domínio C-terminal chamado domínio S (cinza). Os domínios S e L são conectados por um loop que auxilia na estabilização da estrutura tetramérica por meio da interação com os monômeros vizinhos. O tetrâmero, de forma geral, é composto por quatro monômeros iguais entre si, cada um com um sítio ativo (A, B, C e D), que está localizado no domínio L. O sítio catalítico por sua vez é localizado na interface entre dois monômeros. Como esperado, não só as sequências de aminoácidos da HMG-CoA-redutase são conservado nos diferentes cestódeos (Figura 9A), mas também as suas estruturas terciárias (Figura 9B). Além disso, como esperado, a estrutura geral da enzima nos diferentes cestódeos analisados é semelhante àquela da HMG-CoA-redutase humana (Figura Suplementar 2).

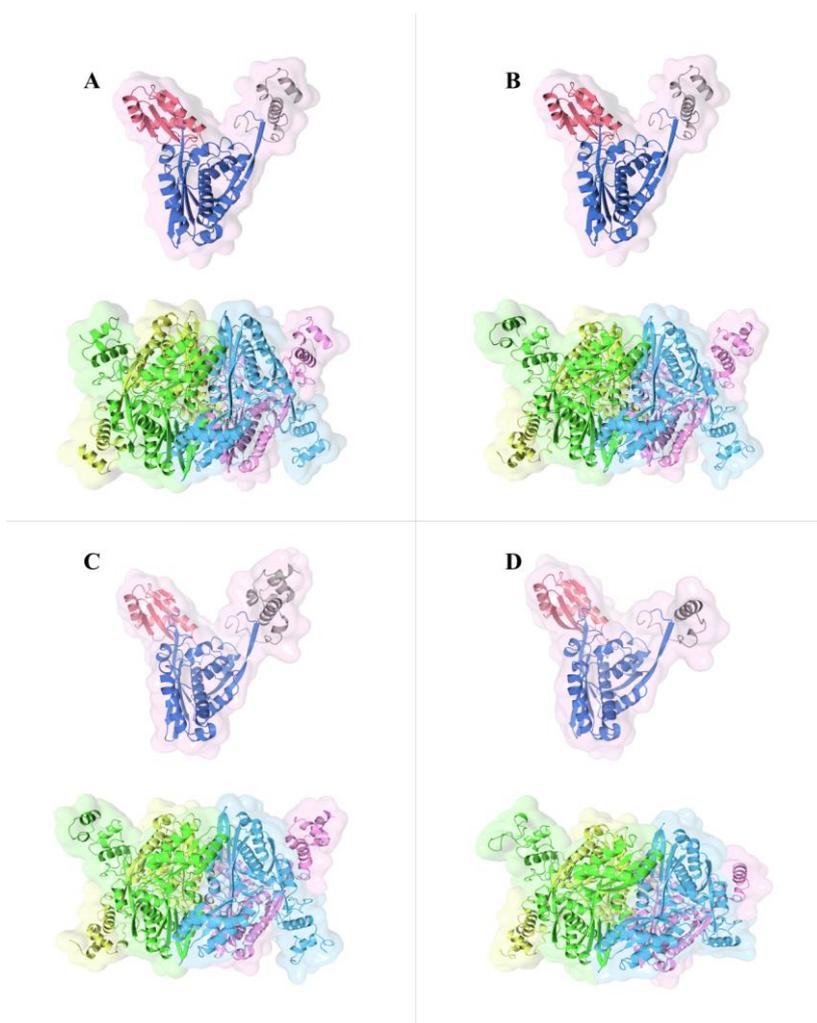


Figura 6. Estruturas tridimensionais da McosHMGCR, da EmHMGCR, da EgHMGCR e da TsHMGCR. Os domínios nos diferentes monômeros (superior) são representados pelas diferentes cores: domínio N (Rosa forte), domínio L (Azul forte), e domínio S (Cinza). Nos tetrâmeros (inferior), as diferentes cadeias são apresentadas pelas seguintes cores: Cadeia A (Verde), cadeia B (Amarelo), cadeia C (Rosa fraco), e cadeia D (Azul fraco). (A) Representação da estrutura do monômero de McosHMGCR com os diferentes domínios: domínio N (resíduos 446-511), domínio L (resíduos 512-574 e 678-838), e domínio S (resíduos 575-677). Representação da estrutura do tetrâmero de McosHMGCR. (B) Representação da estrutura do monômero de EmHMGCR com os diferentes domínios: domínio N (resíduos 136-220),

domínio L (resíduos 221-238 e 387-547), e domínio S (resíduos 284-386). Representação da estrutura do tetrâmero de EmHMGCR. **(C)** Representação da estrutura do monômero de EgHMGCR com os diferentes domínios: domínio N (resíduos 100-184), domínio L (resíduos 185-249 e 340-511), e domínio S (resíduos 250-339). Representação da estrutura do tetrâmero de EgHMGCR. **(D)** Representação da estrutura do monômero de TsHMGCR com os diferentes domínios: domínio N (resíduos 318-357), domínio L (resíduos 358-422 e 513-684), e domínio S (resíduos 284-386). Representação da estrutura do tetrâmero de TsHMGCR.

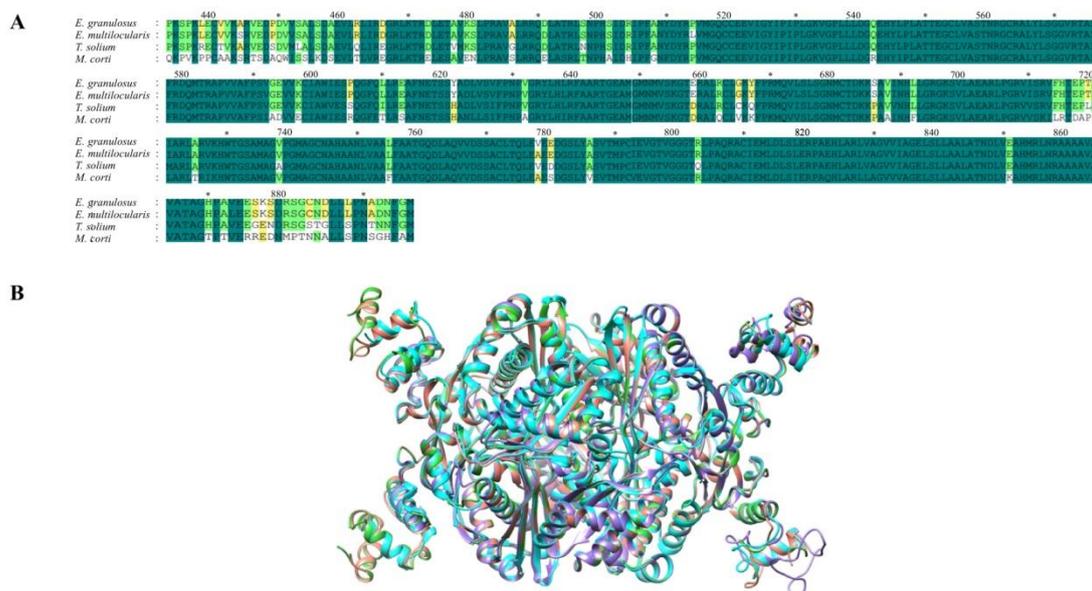


Figura 7. Comparação de McosHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR. **(A)** Alinhamento das seqüências de aminoácidos do domínio catalítico (resíduos 460-888) de McosHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR. As regiões em verde escuro indicam os aminoácidos conservados. As regiões em verde claro indicam substituições conservativas de aminoácidos. As regiões em branco indicam as variações de aminoácidos. **(B)** Comparação por sobreposição das estruturas de McosHMGCR (ciano), EmHMGCR (salmão), EgHMGCR (verde) e TsHMGCR (roxo).

5.4. Interações da sinvastatina e da fluvastatina com o sítio ativo das HMG-CoA-redutases dos cestódeos *M. corti*, *E. multilocularis*, *E. granulosus* e *T. solium*

Para a avaliação das possíveis formas de interações dos fármacos sinvastatina e fluvastatina com o sítio ativo de McosHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR foram realizados experimentos de *docking* molecular no servidor do DockThor. Os parâmetros para o *docking* molecular foram calibrados através da estratégia de *redocking* utilizando como referência as estruturas da HMG-CoA-redutase humana (HsHMGCR) complexada com a sinvastatina (PDB ID: 1hw9) ou fluvastatina (PDB ID: 1hwi). O resultado de *redocking* da sinvastatina com a HsHMGCR obteve um escore de afinidade de ligação de -8,624 (Tabela 2). Observamos que a sinvastatina interage com os resíduos Glu559, Lys691, Lys735 e Asn755 da cadeia C e com os resíduos Arg590 e Ser684 da cadeia D (Figura Suplementar 3A). Por outro lado, o resultado de *redocking* da fluvastatina com a HsHMGCR obteve um escore de afinidade de ligação de -9,230 (Tabela 2). A fluvastatina interage com a HsHMGCR através de ligações de hidrogênio com os resíduos Glu559,

Lys735 e Asn755 da cadeia C e com os resíduos Arg590, Ser684, Asp690 e Lys691 da cadeia D (Figura Suplementar 3B). Estes valores nos servem para fins de comparação.

Tabela 2. Resultados de *docking* molecular dos fármacos sinvastatina e fluvastatina. Escore de afinidade de ligação (dada em kcal/mol) dos fármacos sinvastatina e fluvastatina com a HsHMGCR, McosHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR.

| Enzimas | sinvastatina | fluvastatina |
|-----------|--------------|--------------|
| HsHMGCR | -8,624 | -9,230 |
| McosHMGCR | -8,391 | -8,607 |
| EmHMGCR | -8,150 | -8,564 |
| EgHMGCR | -8,079 | -8,103 |
| TsHMGCR | -8,172 | -8,883 |

Para McosHMGCR o escore de afinidade de ligação da enzima alvo com a sinvastatina foi de -8,391 e com a fluvastatina de -8,607 (Tabela 2). A sinvastatina interage com os resíduos Glu543 e Lys719 da cadeia C e com os resíduos Arg574, Ser668 e Asp674 da cadeia D (Figura 10A parte superior). Por outro lado a fluvastatina interage com os resíduos Glu543 e Lys719 da cadeia C e com os resíduos Arg574 e Ser668 da cadeia D (Figura 10A parte inferior).

O escore de afinidade de ligação de EmHMGCR com a sinvastatina foi de -8,150 e com a fluvastatina de -8,564 (Tabela 2). As interações da EmHMGCR com a sinvastatina e são realizadas com os resíduos Glu252, Lys428 e Asn450 da cadeia C e com os resíduos Arg283 e Ser377 da cadeia D (Figura 10B parte superior). Por sua vez, a fluvastatina interage com os resíduos Glu252, Lys428 e Asn450 da cadeia C e com os resíduos Arg283, Ser354, Ser377 e Asp383 da cadeia D (Figura 10B parte inferior).

Por sua vez, o escore de afinidade de EgHMGCR com a sinvastatina foi de -8,079 e com a fluvastatina de -8,103 (Tabela 2). A sinvastatina interage com os resíduos Glu216, Lys392 da cadeia C e com os resíduos Arg247 e Ser341 da cadeia D (Figura 10C parte superior). Já a fluvastatina interage com os resíduos Glu216 e Lys392 da cadeia C e com os resíduos Arg247, Ser341 e Asp347 da cadeia D (Figura 10C parte inferior).

Por último, o escore de afinidade de ligação de TsHMGCR com a sinvastatina foi de -8,172 e com a fluvastatina de -8,883 (Tabela 2). A sinvastatina interage com os resíduos Glu389, Lys565 e Asn587 da cadeia C e com os resíduos Arg420 e Ser514 da cadeia D (Figura 10D parte superior). Por outro lado a fluvastatina interage com os resíduos Glu389 e Lys565 da cadeia C e com os resíduos Arg420, Ser514 e Asp520 da cadeia D (Figura 10D parte inferior).

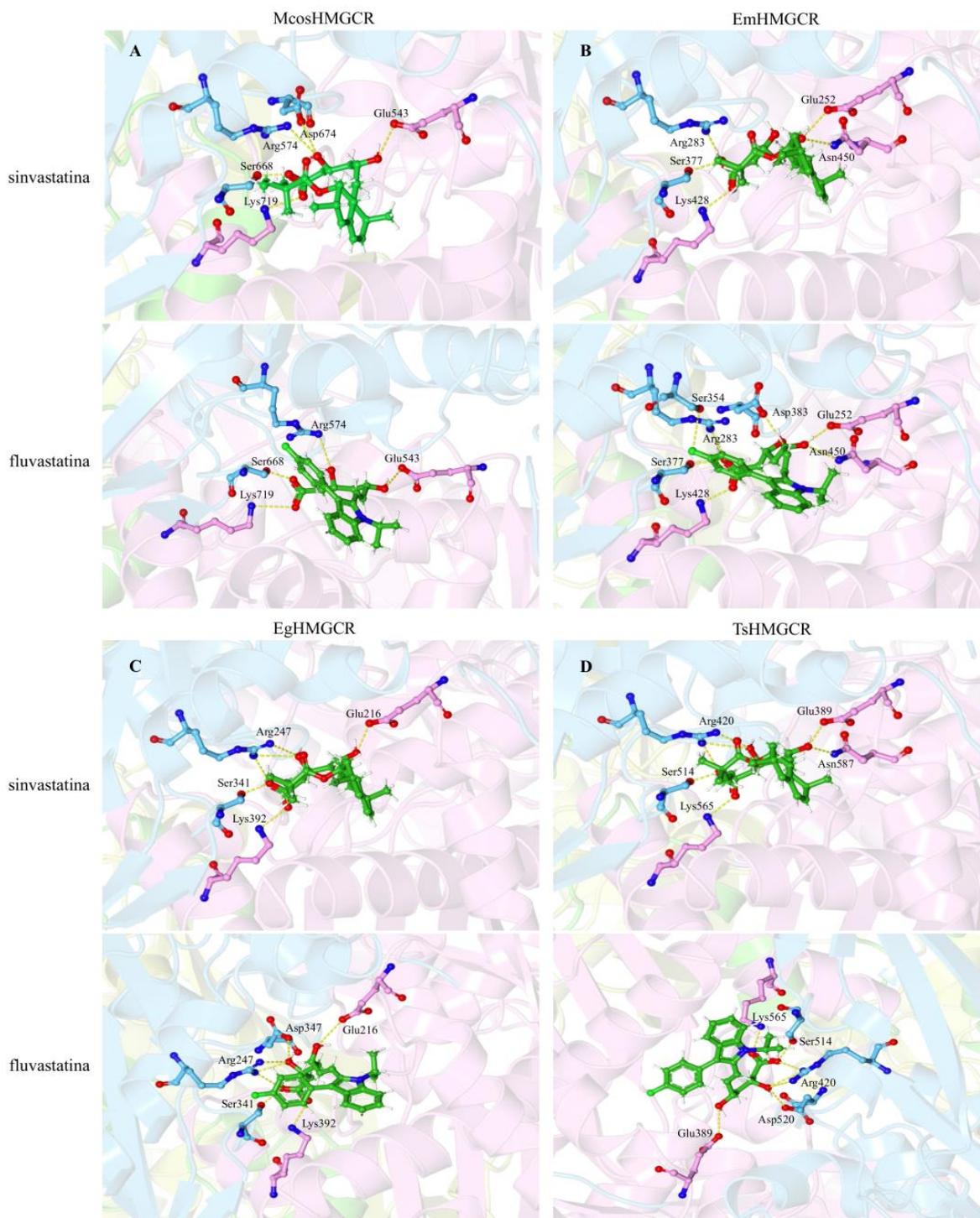


Figura 8. Figura 4. Representação dos modos de interação da simvastatina ou fluvastatina com McosHMGCRCR, EmHMGCRCR, EgHMGCRCR e TshHMGCRCR. Representação dos sítios ativos (localizados entre as cadeias C e D) de McosHMGCRCR, EmHMGCRCR, EgHMGCRCR e TshHMGCRCR (A, B, C e D respectivamente). As diferentes cadeias estão representadas em rosa (cadeia C) e azul (cadeia D). As interações da simvastatina ou fluvastatina com os resíduos da HMGCR estão representadas por linhas pontilhadas em amarelo (ligações de hidrogênio). As estruturas da simvastatina ou fluvastatina estão representadas em verde.

6. Discussão

Dentre as cestodíases, as infecções causadas pelas formas larvais de parasitos da classe Cestoda são as mais importantes, por serem de difícil tratamento e terem grande impacto na saúde pública humana e animal (Saari; Näreaho; Nikander, 2019). A capacidade de infectar uma grande diversidade de animais e a facilidade na transmissão entre os hospedeiros contribui para que as equinococoses (causada por *Echinococcus* spp.) tenham uma ocorrência mundial causando impactos tanto médicos como econômicos. Tendo em vista que o tratamento das equinococoses (ou cestodíases) e das cisticercoses, além de limitado, não é efetivo quando se trata de doenças causadas pelas formas larvais de cestódeos, faz-se necessário buscar novas formas terapêuticas para o tratamento das cestodíases (Sangster; Angster; Cowling; Woodgate, 2018). Assim, estudos que envolvem estratégias como o reposicionamento de fármacos tornam-se interessantes, pois diferente das estratégias tradicionais (desenvolvimento de novos fármacos), esta estratégia é mais rápida e econômica. De forma geral, a estratégia de reposicionamento de fármacos consiste em três tipos de abordagens: (i) abordagens computacionais; (ii) abordagens experimentais; e (iii) abordagens mistas (Xue et al., 2018). O presente trabalho utilizou abordagens computacionais como a modelagem comparativa e *docking* molecular para avaliar as possíveis formas de interações dos fármacos simvastatina e fluvastatina com a HMG-CoA-redutase do cestódeo-modelo *M. corti* e dos cestódeos de relevância médica e veterinária *E. multilocularis*, *E. granulosus* e *T. solium*.

A busca por ortólogos da HMG-CoA-redutase em helmintos e nematódeos parasitas e seus respectivos hospedeiros revelou que as sequências de aminoácidos variam em seu tamanho, identidade e similaridade. Em média as sequências de aminoácidos ortólogas da HMG-CoA-redutase apresentaram tamanho médio de 792 aa, 37% de identidade e 50% de similaridade. Como esperado, o domínio catalítico da enzima (resíduos 587-1102) se mostrou altamente conservado (aminoácidos com 100% de conservação e aminoácidos com 80% de conservação). O sequenciamento de genomas identificou o gene da HMG-CoA-redutase em organismos de todos os três domínios da vida (Archaea, Bacteria e Eukarya), e uma comparação de sequências de aminoácidos e análise filogenética mostrou que o domínio catalítico é altamente conservado nos eucariotos, embora o domínio de âncora de membrana seja menos conservado (Friesen; Rodwell, 2004).

A análise filogenética revelou três clados distintos: cordados, platelmintos e nematódeos. Já os platelmintos foram divididos em dois grupos monofiléticos de vermes parasitas, um correspondendo a trematódeos e o outro a cestódeos. A distinção dos organismos analisados demonstra que as espécies intimamente relacionadas se agrupam no mesmo ramo. A análise evolutiva do gene da HMG-CoA-redutase pode indicar que este gene diversificou em paralelo com a divisão taxonômica. Além disso, a análise filogenética indica que existe uma relação entre as

espécies de platelmintos, nematódeos e cordados e que provavelmente estes organismos se originaram de um ancestral comum. A conservação evolutiva da HMG-CoA-redutase já foi avaliada entre diferentes grupos taxonômicos como crustáceos, peixes, aves, insetos, mamíferos e plantas (Zhao et al., 2015; Lü et al., 2016). Em todas as análises filogenéticas a HMG-CoA-redutase se mostrou conservada em diferentes espécies e as sequências de aminoácidos das enzimas se mostraram altamente conservadas no domínio catalítico.

A HMG-CoA-redutase é a enzima central da via do mevalonato, e sua conservação em diferentes organismos pode estar relacionada com a importância desta via. Já foi demonstrado que a inibição da HMG-CoA-redutase pode levar a perda de processos como ubiquitinação, prenilação e glicosilação proteica (Ranji et al., 2014; Rauthan; Pilon, 2011). No protozoário *Entamoeba histolytica* e no helminto *S. mansoni*, foi demonstrado que a inibição da HMG-CoA-redutase e da enzima farnesiltransferase, a última enzima comum para produtos derivados da via do mevalonato, leva a perda de diversas funções, incluindo a diferenciação e o crescimento celular (Probst et al., 2019). Em cestódeos, componentes da via do mevalonato também foram identificados em seu genoma (Coghlan et al., 2019). No cestódeo *E. multilocularis*, já foi demonstrado que proteínas Ral (Ras-like), que compreendem a superfamília RAS de pequenas GTPases, sofrem prenilação na forma de geranilgeranilação pela enzima geranilgeranil transferase, enzima também responsável por produtos derivados da via do mevalonato. Portanto, a inibição da HMG-CoA-redutase e da geranilgeranil transferase poderia levar a perda de diversas funções (processos-chave da célula) das proteínas Ral, como o transporte e migração de vesículas e a divisão celular (Spiliotis; Brehm, 2004).

Considerando a conservação da HMG-CoA-redutase em helmintos e nematódeos parasitas e seus hospedeiros, como esperado, as estruturas preditas de McoSHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR mostraram-se similar com a organização estrutural da HsHMGCR. Os modelos gerados de McoSHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR apresentaram quatro monômeros idênticos entre si e no monômero foi possível identificar as regiões do N-domínio, L-domínio e S-domínio. A conservação da estrutura geral da HMG-CoA-redutase já foi observada em outros organismos como: plantas, fungos (por modelagem comparativa) e arqueas (por cristalografia de raios-x) (Andrade-Pavón et al., 2017; Kalita et al., 2015; Srinath et al., 2020; Vögeli et al., 2019). Em ambas as estratégias, foram observadas que a estrutura da HMG-CoA-redutase é conservada entre os eucariotos e algumas arqueas.

Uma comparação entre seis complexos estruturais de estatinas com a HMG-CoA-redutase demonstrou que há diferenças muito sutis em seus modos de ligação (Istvan, 2001). Estas semelhanças nos modos de ligação podem ajudar entender o motivo pela qual as interações preditas da sinvastatina e da fluvastatina com McoSHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR são

muito semelhantes. A forte ligação das estatinas é provavelmente devido ao grande número de interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio entre os inibidores e a HMG-CoA-redutase. As estatinas possuem em sua estrutura uma porção semelhante à HMG-CoA e uma porção rígida e hidrofóbica. Quando as estatinas se ligam a HMG-CoA-redutase, os compostos hidrofóbicos volumosos destes fármacos ocupam a bolsa de ligação da HMG e parte da superfície de ligação do CoA. Assim, o acesso do substrato da HMG-CoA a HMG-CoA-redutase é bloqueada quando as estatinas são ligadas (Istvan et al., 2000).

Além disso, os resíduos presentes em McosHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR que interagem com a sinvastatina e fluvastatina parecem estar nas mesmas posições dos resíduos que interagem com os inibidores nos cristais de HsHMGCR, o que reforça a hipótese de que os resíduos de aminoácidos são conservados em helmintos e nematódeos parasitas e seus respectivos hospedeiros. Considerando a conservação dos resíduos de aminoácidos e da estrutura geral das HMG-CoA-redutases, estes resultados podem indicar que a HMG-CoA-redutase de cestódeos podem ser inibidos pelas estatinas e que esses efeitos inibitórios podem ser letais para cestódeos larvais.

7. Conclusões

- A conservação evolutiva da HMG-CoA-redutase em platelmintos, nematódeos e seus respectivos hospedeiros indica a conservação da enzima nos organismos analisados.
- A modelagem comparativa demonstrou que a estrutura da HMG-CoA-redutase é conservada no cestódeo-modelo *M. corti* e nos cestódeos de relevância médica e veterinária *E. multilocularis*, *E. granulosus* e *T. solium*.
- As interações preditas da sinvastatina e fluvastatina com os modelos McosHMGCR, EmHMGCR, EgHMGCR e TsHMGCR podem estar indicando a inibição da enzima.

8. Perspectivas

- Avaliar *in vitro* os possíveis efeitos dos fármacos inibidores sinvastatina e fluvastatina sobre tetratirídeos de *M. corti*.
- Confirmar a inibição da enzima HMG-CoA-redutase de *M. corti* pela sinvastatina e pela fluvastatina.
- Identificar os mecanismos diretos e indiretos de ação da sinvastatina e da fluvastatina sobre tetratirídeos de *M. corti*.
- Avaliar *in vivo* os possíveis efeitos da sinvastatina e da fluvastatina sobre tetratirídeos de *M. corti*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, J. I. et al. *Mesocestoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. **Parasitology**, v. 137, n. 3, p. 359-372, mar. 2010.
- ANDRADE-PAVÓN, D. et al. Recombinant 3-Hydroxy 3-Methyl Glutaryl-CoA Reductase from *Candida glabrata* (Rec-CgHMGR) Obtained by Heterologous Expression, as a Novel Therapeutic Target Model for Testing Synthetic Drugs. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 4, p. 1478–1490, 2017.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 673-683, 2004.
- AYDIN, Y. et al. Relevance of Pulmonary Alveolar Echinococcosis. **Archivos de Bronconeumologia**, v. 56, n. 12, p. 779–783, 2020.
- BASIKA, T. et al. Transcriptomic profile of two developmental stages of the cestode parasite *Mesocestoides corti*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 229, p. 35–46, 2019.
- CAIRA, J. N.; LITTLEWOOD, D. T. J. Worms, Platyhelminthes. **Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition**, v. 7, p. 437-469, 2013.
- CAMARGO DE LIMA, J. et al. Dynamics of protein synthesis in the initial steps of strobilation in the model cestode parasite *Mesocestoides corti* (syn. *vogae*). **Journal of Proteomics**, v. 228, n. August, p. 103939, 2020.
- CASULLI, A.; SILES-LUCAS, M.; TAMAROZZI, F. *Echinococcus granulosus sensu lato*. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 8, p. 663–664, 2019.
- CLAEREBOU, E. et al. Anthelmintic resistance and common worm control practices in sheep farms in Flanders, Belgium. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 20, n. January, p. 100-393, 2020.
- COGHLAN, A. et al. Comparative genomics of the major parasitic worms. **Nature Genetics**, v. 51, n. 1, p. 163–174, 2019.
- COLLINS, J. J. Platyhelminthes. **Current Biology**, v. 27, n. 7, p. R252–R256, 2017.
- COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, v. 2, n. 9, p. 1511–1519, 1993.
- COPPENS, I., AND COURTOY, P.-J. 1996. MINIREVIEW The Mevalonate Pathway in Parasitic Protozoa and Helminths. v. 85, p. 76–85, 1996.
- CRAIG, P. S. et al. Prevention and control of cystic echinococcosis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 385-394, 2007.
- DAIPERT-GARCIA, D. et al. Genetic diversity of *Echinococcus vogeli* in the western Brazilian Amazon. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 9, p. 11–14, 2019.

- DEMIERRE, M. F. et al. Statins and cancer prevention. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 12, p. 930-942, dez. 2005.
- DEPLAZES, P. et al. Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. **Advances in Parasitology**, 2017.
- DIXIT, P.; KOTRA, L. P. Cestode disease. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, p. 1-4, 2007.
- DIXON, M. A. et al. Force-of-infection of *Taenia solium* porcine cysticercosis: a modelling analysis to assess global incidence and prevalence trends. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.
- ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. 1992. **Atherosclerosis. Supplements**, v. 5, n. 3, p. 67-80, 2004.
- FRIESEN, J. A.; RODWELL, V. W. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. **Genome Biology**, v. 5, n. 11, p. 7, 2004b.
- GILMAN, R. H. et al. Prevention and control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in Peru. **Pathogens and Global Health**, v. 106, n. 5, p. 312-318, 2012.
- GRIPPER, L. B.; WELBURN, S. C. Neurocysticercosis infection and disease—A review. **Acta Tropica**, v. 166, p. 218-224, 2017.
- HABY, M. M. et al. Systematic review of the effectiveness of selected drugs for preventive chemotherapy for *taenia solium* taeniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1-31, 2020.
- HEMPHILL, A. Development and applications of cestode and trematode laboratory models. **Parasitology**, v. 137, n. 3, p. 329-333, 2010.
- HIGUITA, N. I. A.; BRUNETTI, E.; MCCLOSKEY, C. Cystic Echinococcosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 518-523, mar. 2016.
- HOSHINO, Y.; GAUCHER, E. A. On the origin of isoprenoid biosynthesis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 9, p. 2185-2197, 2018.
- HOWE, K. L. et al. WormBase ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 215, p. 2-10, 2017.
- ISTVAN, E. S. et al. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: Insights into regulation of activity and catalysis. **EMBO Journal**, 2000.
- ISTVAN, E. S. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1160-1164, 2001.
- J.U. BOWIE, R. LÜTHY, D. EISENBERG, 1991. A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 253, n. 58, p. 951-952, 1991.

- KALITA, R. et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Centella asiatica* L. **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 9, p. 1431–1439, 2015.
- KARLIC, H.; VARGA, F. Mevalonate Pathway. **Reference Module in Biomedical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 445-457, 2017. KERN, P. et al. The Echinococcoses: Diagnosis, Clinical Management and Burden of Disease. **Advances in Parasitology**, 2017.
- KIRBY, J.; KEASLING, J. D. Biosynthesis of plant isoprenoids: Perspectives for microbial engineering. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 335–355, 2009.
- KOZIOL, U. Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes. **Experimental Parasitology**, v. 180, p. 84–100, 2017.
- LAM, N. S. et al. Artemisinin and its derivatives in treating helminthic infections beyond schistosomiasis. **Pharmacological Research**, v. 133, p. 77–100, 2018.
- LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007.
- LIAO, JAMES K. AND LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 5, p. 89–118, 2005.
- LIAO, P. et al. The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 697–713, 2016.
- LITTLEWOOD, D. T. J.; ROHDE, K.; CLOUGH, K. A. The interrelationships of all major groups of Platyhelminthes: Phylogenetic evidence from morphology and molecules. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 66, n. 1, p. 75–114, 1999.
- LÜ, S. et al. 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase: An essential actor in the biosynthesis of cantharidin in the blister beetle *Epicauta chinensis* Laporte. **Insect Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 58–71, 2016.
- LUNDSTRÖM-STADELMANN, B.; RUFENER, R.; HEMPHILL, A. Drug repurposing applied: Activity of the anti-malarial mefloquine against *Echinococcus multilocularis*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 13, n. June, p. 121–129, 2020.
- LUSTIGMAN, S. et al. A research agenda for helminth diseases of humans: The problem of helminthiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. 1-13, abr. 2012.
- MANTEROLA, C. et al. *Echinococcus granulosus* sensu lato Genotypes in Different Hosts Worldwide: A Systematic Review. **Acta Parasitologica**, 2021.
- MARKOSKI, M. M. et al. In vitro segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. **The Journal of parasitology**, v. 89, n. 1, p. 27–34, fev. 2003.
- MARKOSKI, M. M. et al. In vitro segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. **The Journal of parasitology**, v. 89, n. 1, p. 27–34, fev. 2003.
- MARTINS, I. V. F. Parasitologia-Veterinaria_Livro-Digital. **Editora da Universidade Federal do Espírito Santo**, 2ª ed. ISBN: 978-85-7772-428-4, 2019.

- MEHLHORN, H.; ASPÖCK, H. Encyclopedia of parasitology. **Springer**, v. 1, p. 1-1573, 2008.
- MORRIS, A. L. et al. Stereochemical quality of protein structure coordinates. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 345–364, 1992.
- MUTHYALA, R. Orphan/rare drug discovery through drug repositioning. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 8, n. 3-4, p. 71-76, 2012.
- NAKAO, M. et al. State-of-the-art Echinococcus and Taenia: Phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 4, p. 444-452, maio. 2010.
- NEVES, D. P. et al. Parasitologia Humana. **Atheneu**, p. 498, 2011.
- OLSON, P. D. et al. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 7, p. 733–755, 2003.
- PALUDO, G. P. et al. Cestode strobilation: Prediction of developmental genes and pathways. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1–16, 2020.
- PANIC, G. et al. Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 3, p. 185-200, 2014.
- PARQUET, V. et al. Atorvastatin as a potential anti-malarial drug: *in vitro* synergy in combinational therapy with quinine against *Plasmodium falciparum*. **Malaria journal**, v. 9, p. 139, 2010.
- PERES, R. B. et al. Repurposing Strategy of Atorvastatin against *Trypanosoma cruzi*: *In Vitro* Monotherapy and Combined Therapy with Benznidazole Exhibit Synergistic Trypanocidal Activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 9, p. 1–9, 2018.
- PROBST, A. et al. Bioactivity of farnesyltransferase inhibitors against *entamoeba histolytica* and *schistosoma mansoni*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. MAY, 2019.
- R. LÜTHY; J.U. BOWIE, D. EISENBERG, 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 359, p. 167–169, 1992.
- RAMIANDRASOA, N. S. et al. Impact of a 3-year mass drug administration pilot project for taeniasis control in Madagascar. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 9, p. 1–13, 2020.
- RANJI, P. et al. Loss of HMG-CoA reductase in *C. elegans* causes defects in protein prenylation and muscle mitochondria. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.
- RAUTHAN, M.; PILON, M. The mevalonate pathway in *C. Elegans*. **Lipids in health and disease**, 2011. Disponível em: <<http://www.lipidworld.com/content/10/1/243>>.
- ROJO-ARREOLA, L. et al. Chemical and genetic validation of the statin drug target to treat the helminth disease, schistosomiasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 29 jan. 2014.
- RUFENER, R. et al. Repurposing of an old drug: *In vitro* and *in vivo* efficacies of buparvaquone against *Echinococcus multilocularis*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 440–450, 2018.

- SAARI, S.; NÄREAHO, A.; NIKANDER, S. Cestoda (Tapeworms). **Canine Parasites and Parasitic Diseases**, p. 55–81, 2019.
- SANGSTER, N. C.; COWLING, A.; WOODGATE, R. G. Ten Events That Defined Anthelmintic Resistance Research. **Trends in Parasitology**, 2018.
- SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: An update. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 117–125, 2005.
- SOLOMON, K. R.; FREEMAN, M. R. Do the cholesterol-lowering properties of statins affect cancer risk? **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 113–121, 2008.
- SPILIOTIS, M.; BREHM, K. *Echinococcus multilocularis*: Identification and molecular characterization of a Ras-like small GTP-binding protein. **Experimental Parasitology**, v. 107, n. 3–4, p. 163–172, 2004.
- SRINATH, M. et al. Isolation, characterization and *in silico* analysis of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGR) gene from *Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 1, p. 639–654, 2020.
- STEUSSY, C. N. et al. A novel role for coenzyme a during hydride transfer in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase. **Biochemistry**, v. 52, n. 31, p. 5195–5205, 2013.
- TOLEDO, R.; FRIED, B. Trematoda (flukes). n. December, p. 651–657, 2017.
- VÖGELI, B. et al. Crystal structure of archaeal HMG-CoA reductase: insights into structural changes of the C-terminal helix of the class-I enzyme. **FEBS Letters**, v. 593, n. 5, p. 543–553, 2019.
- WANG, Q. et al. Assessment of a 10-year dog deworming programme on the transmission of *Echinococcus multilocularis* in Tibetan communities in Sichuan Province, China. **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 2–3, p. 159–166, 2021.
- WEBB, C.; CABADA, M. M. Intestinal cestodes. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 5, p. 504–510, 2017.
- WEN, H. et al. Echinococcosis: Advances in the 21st century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 1–39, 2019.
- WHITE, A. C.; BRUNETTI, E. Cestodes. **Goldman's Cecil Medicine: Twenty Fourth Edition**, v. 2, p. 2052–2057, 2012.
- WHITE, A. C.; GARCIA, H. H. Updates on the management of neurocysticercosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 31, n. 5, p. 377–382, 2018.
- WOOLSEY, I. D.; MILLER, A. L. *Echinococcus granulosus sensu lato* and *Echinococcus multilocularis*: A review. **Research in Veterinary Science**, v. 135, n. November 2020, p. 517–522, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases**. Disponible em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255011/9789241565448-eng.pdf?sequence=1>>.

XUE, H. et al. Review of drug repositioning approaches and resources. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 10, p. 1232-1244, 2018.

ZHAO, M. et al. Two transcripts of HMG-CoA reductase related with developmental regulation from *Scylla paramamosain*: Evidences from cDNA cloning and expression analysis. **IUBMB Life**, v. 67, n. 12, p. 954–965, 2015.

APÊNDICE I

Figuras suplementares

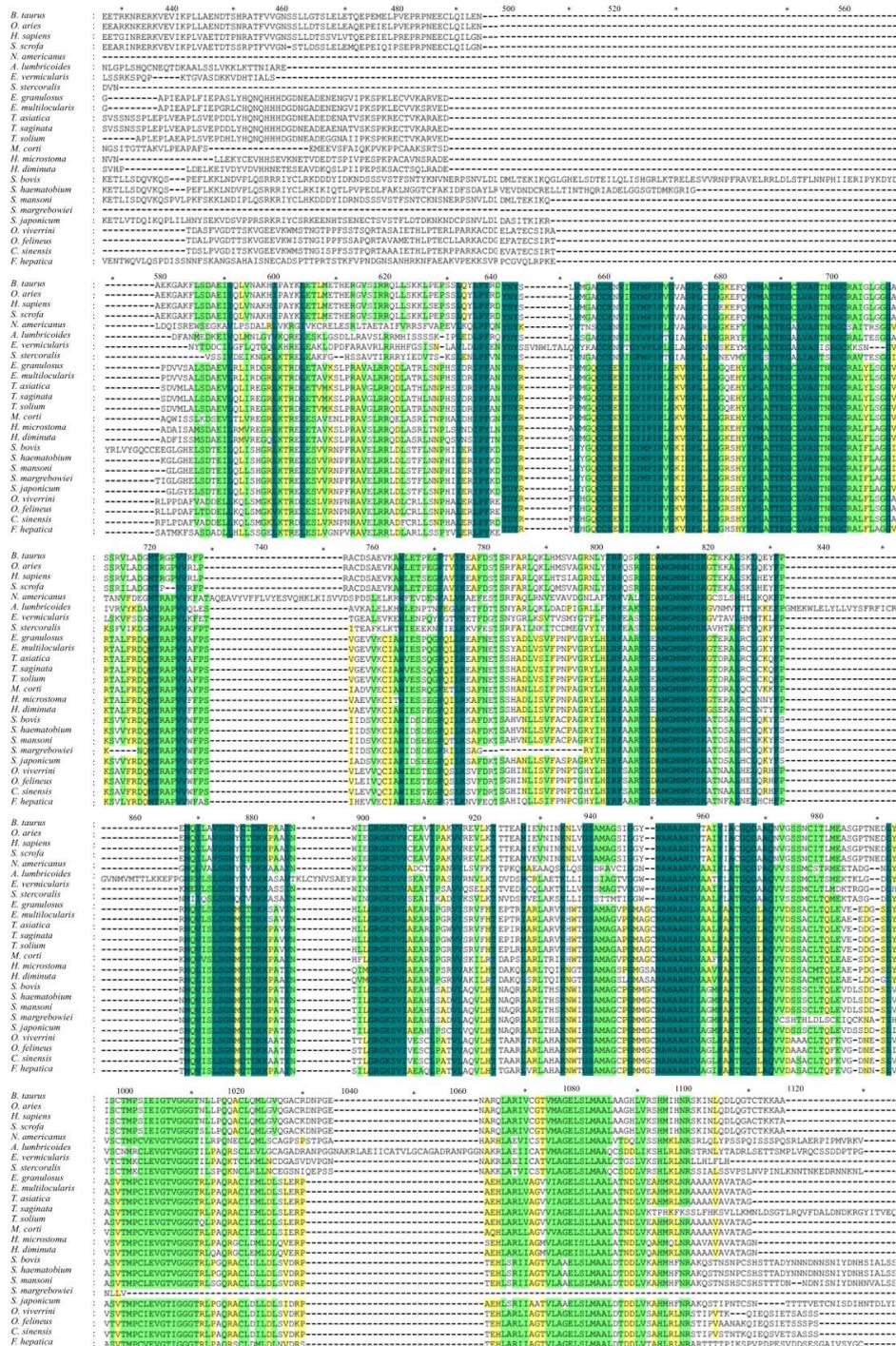


Figura suplementar 4. Alinhamento das sequências de aminoácidos do domínio catalítico (resíduos 587-1102) das HMG-CoA-redutases de platelmintos, nematódeos e seus respectivos hospedeiros. As regiões em verde escuro indicam os aminoácidos conservados. As regiões em verde claro indicam substituições conservativas de aminoácidos. As regiões em branco indicam as variações de aminoácidos.

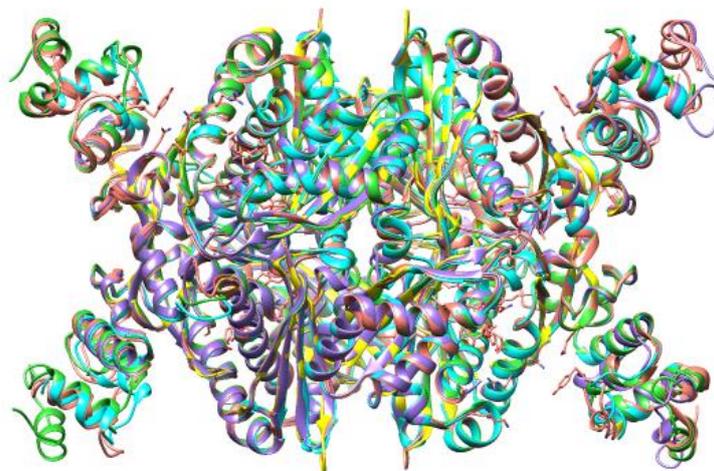


Figura suplementar 5. Comparação das estruturas tridimensionais da HMG-CoA-redutase dos diferentes cestódeos e da hHMGCR (PDB: 1hw9). As diferentes estruturas são representadas pelas diferentes cores: McosHMGCR (ciano), EmHMGCR (salmão), EgHMGCR (verde), TsHMGCR (roxo) e HsHMGCR (amarelo). O alinhamento das estruturas teve um RMSD de 0,361 Å.

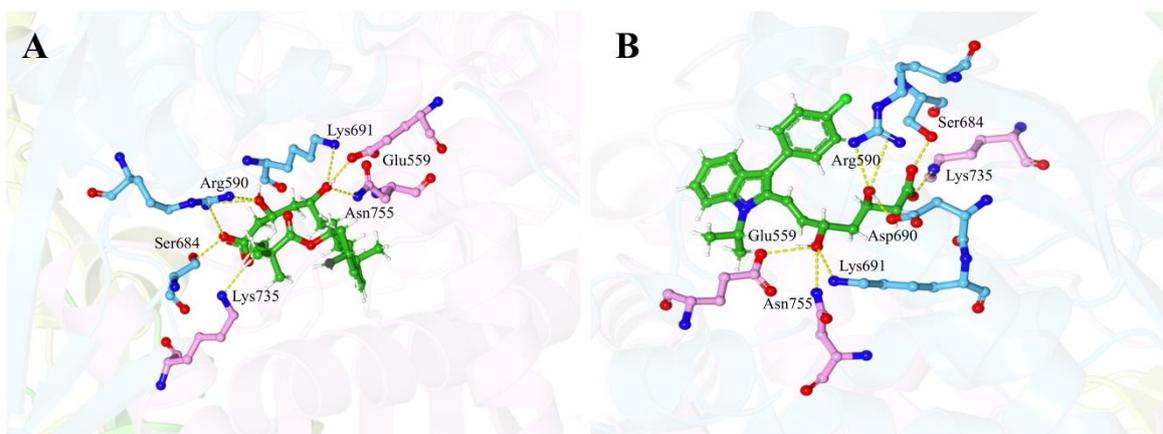
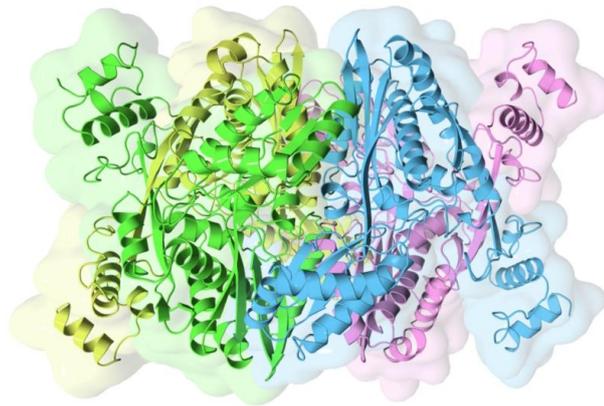


Figura suplementar 6. Representação dos modos de interação da simvastatina ou fluvastatina com a HsHMGCR. Representação dos sítios ativos (localizados entre as cadeias C e D). (A) Modos de interação da simvastatina com a HsHMGCR (PDB: 1hw9). (B) Modos de interação da fluvastatina com a HsHMGCR (PDB: 1hwi). As interações da simvastatina ou fluvastatina com os resíduos da HsHMGCR estão representadas por linhas pontilhadas em amarelo (ligações de hidrogênio). As estruturas da simvastatina e da fluvastatina estão representadas em verde.

APÊNDICE II

Materiais suplementares

Avaliações da estrutura da HMG-CoA-redutase de *M. corti* (McosHMGCR)

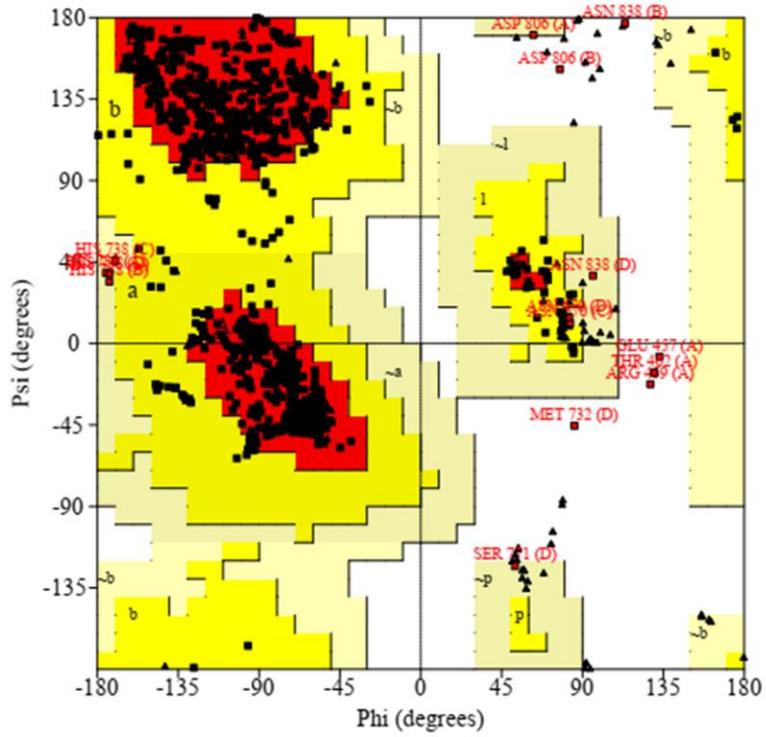


QMEAN



*QMEAN is a composite scoring function which is able to derive both global (i.e. for the entire structure) and local (i.e. per residue) absolute quality estimates on the basis of one single model. By default they are transformed into Z-scores to relate them with what we would expect from high resolution X-ray structures.

RAMACHANDRAN PLOT



Plot statistics

| | | |
|--|------|--------|
| Residues in most favoured regions [A,B,L] | 1237 | 91.0% |
| Residues in additional allowed regions [a,b,l,p] | 107 | 7.9% |
| Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p] | 9 | 0.7% |
| Residues in disallowed regions | --- | ----- |
| Number of non-glycine and non-proline residues | 1359 | 100.0% |
| Number of end-residues (excl. Gly and Pro) | 8 | |
| Number of glycine residues (shown as triangles) | 128 | |
| Number of proline residues | 80 | |
| | --- | |
| Total number of residues | 1575 | |

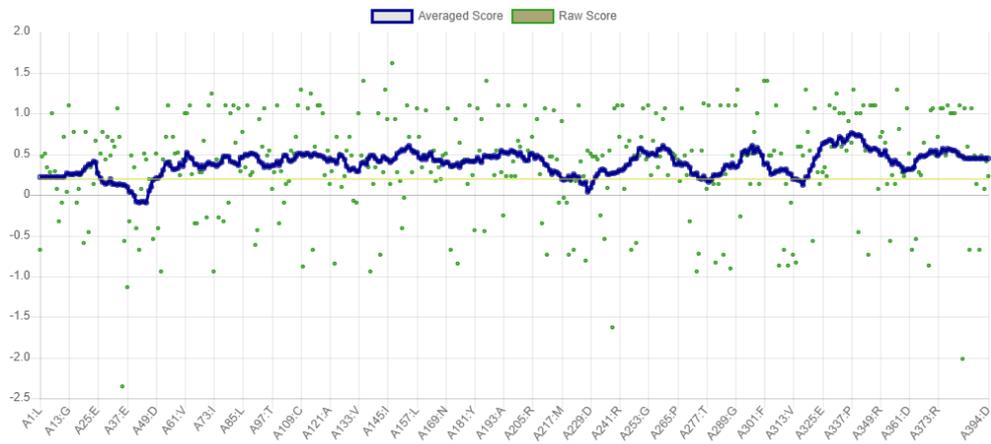
Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20% a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

VERIFY3D

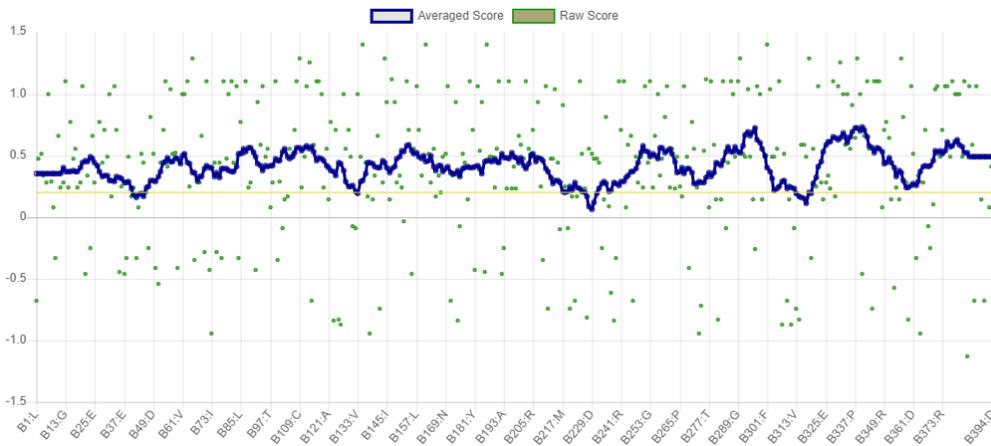
90.98% of the residues have averaged 3D-1D score ≥ 0.2 .
PASS

At least 80% of the amino acids have scored ≥ 0.2 in the 3D/1D profile.

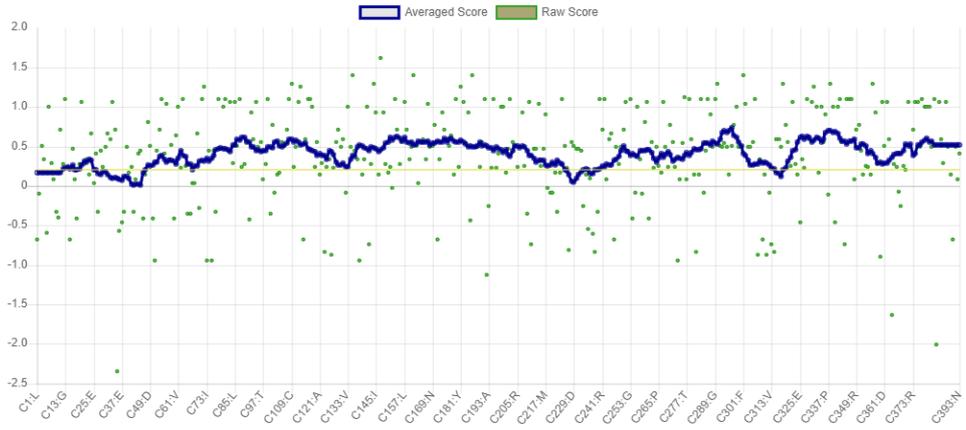
Cadeia A



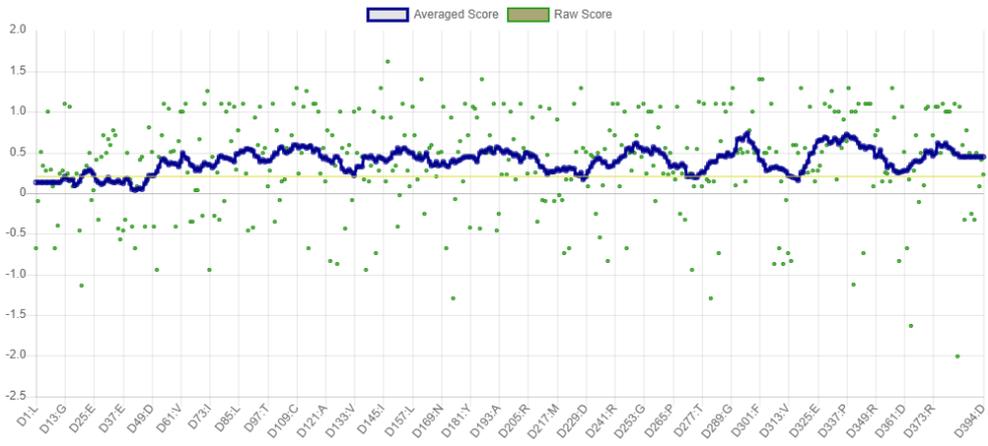
Cadeia B



Cadeia C



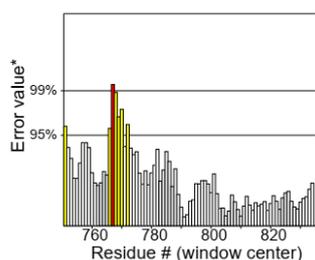
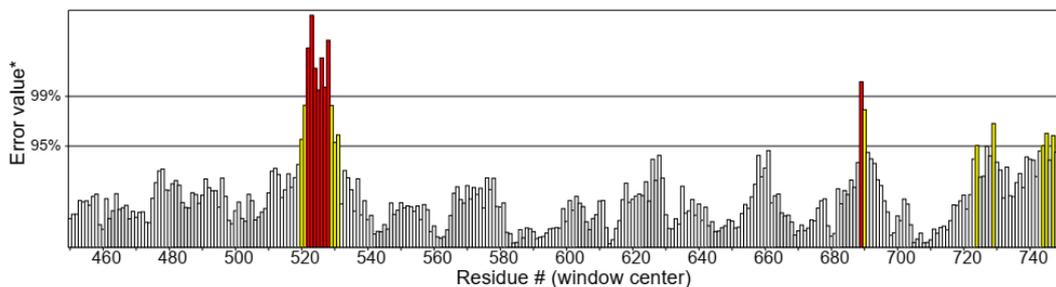
Cadeia D



ERRAT

Cadeia: A

Overall quality factor**: 94.981

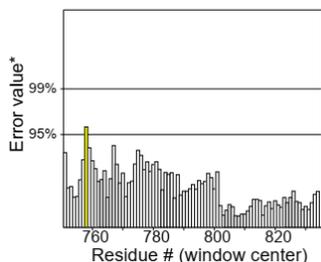
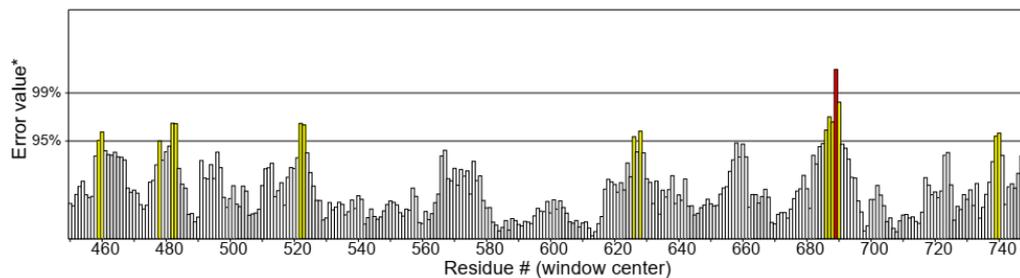


*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Cadeia: B

Overall quality factor**: 94.981

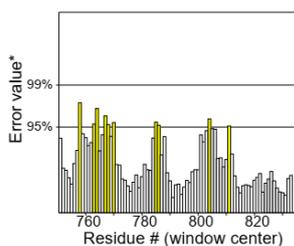
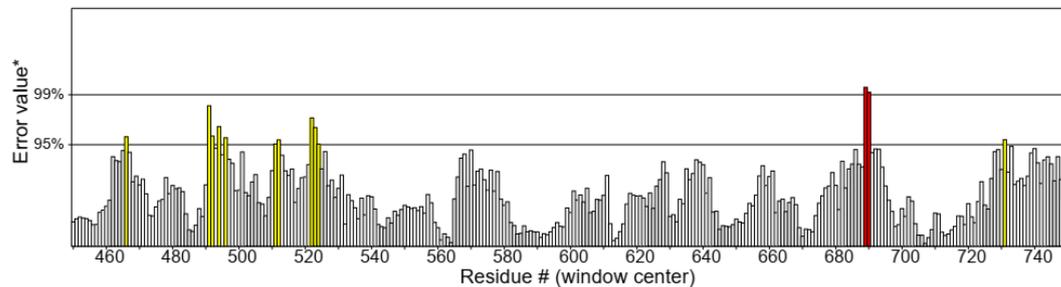


*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Cadeia: C

Overall quality factor**: 94.981

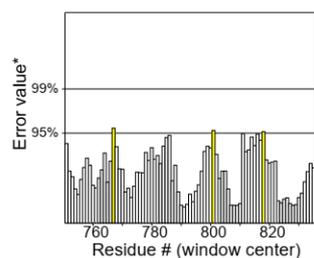
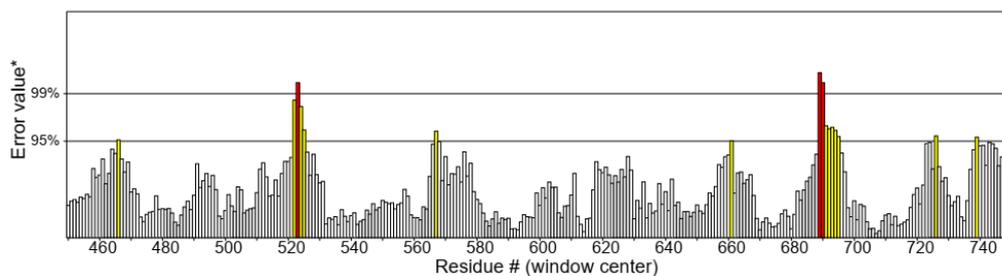


*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Cadeia: D

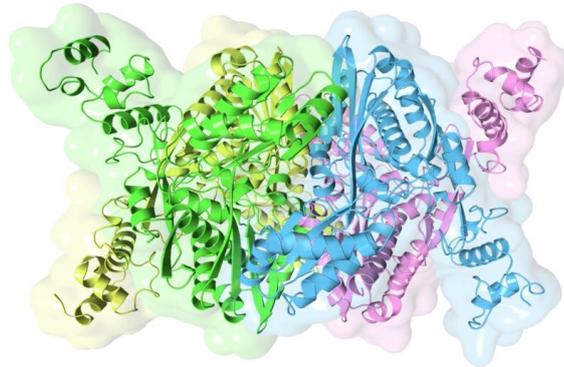
Overall quality factor**: 94.981



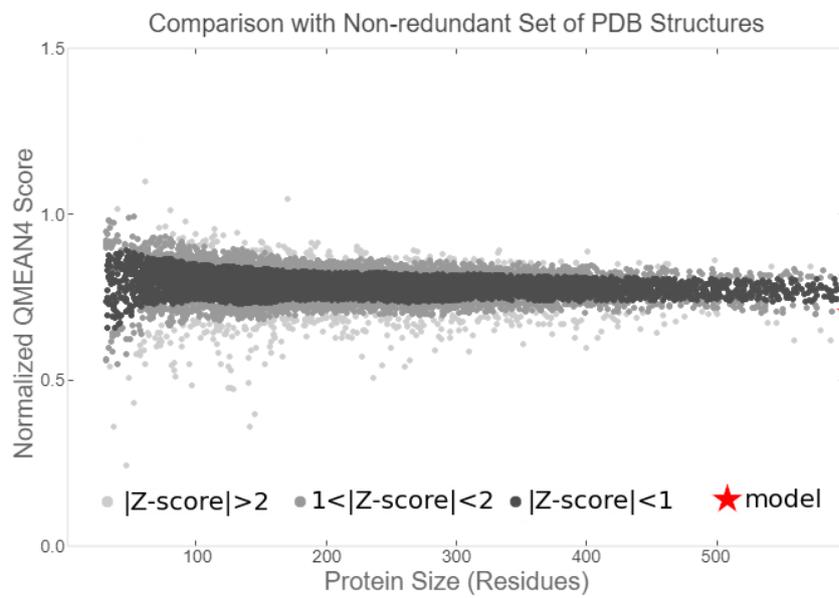
*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Avaliações da estrutura da HMG-CoA-redutase de *E. multilocularis* (EmHMGCR)

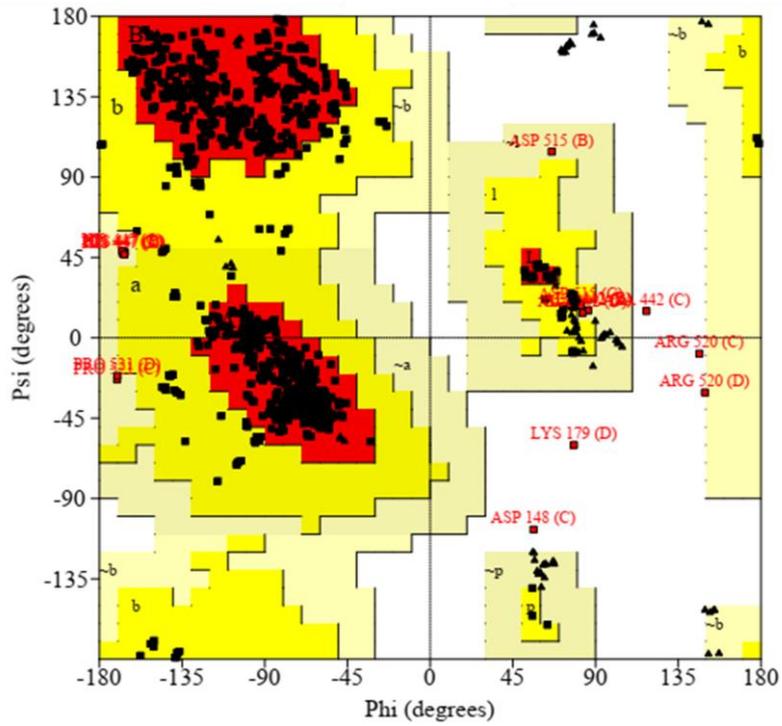


QMEAN



*QMEAN is a composite scoring function which is able to derive both global (i.e. for the entire structure) and local (i.e. per residue) absolute quality estimates on the basis of one single model. By default they are transformed into Z-scores to relate them with what we would expect from high resolution X-ray structures.

RAMACHANDRAN PLOT



Plot statistics

| | | |
|--|------|--------|
| Residues in most favoured regions [A,B,L] | 1292 | 91.2% |
| Residues in additional allowed regions [a,b,l,p] | 110 | 7.8% |
| Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p] | 9 | 0.6% |
| Residues in disallowed regions | --- | ----- |
| Number of non-glycine and non-proline residues | 1416 | 100.0% |
| Number of end-residues (excl. Gly and Pro) | 7 | |
| Number of glycine residues (shown as triangles) | 132 | |
| Number of proline residues | 82 | |
| | --- | |
| Total number of residues | 1637 | |

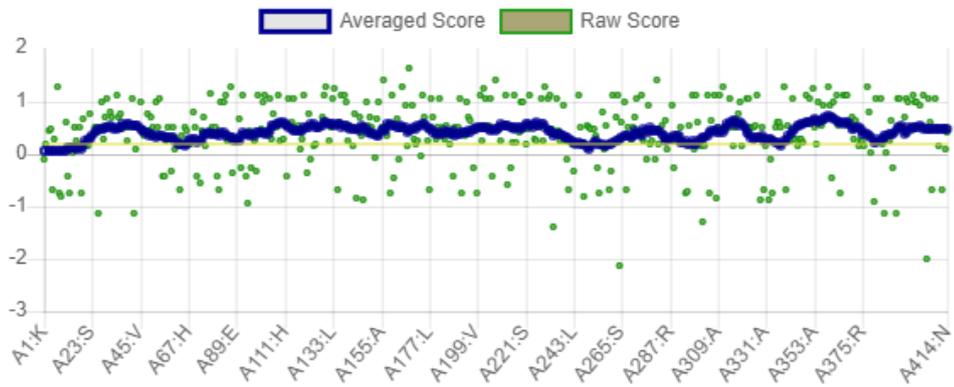
Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20% a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

VERIFY3D

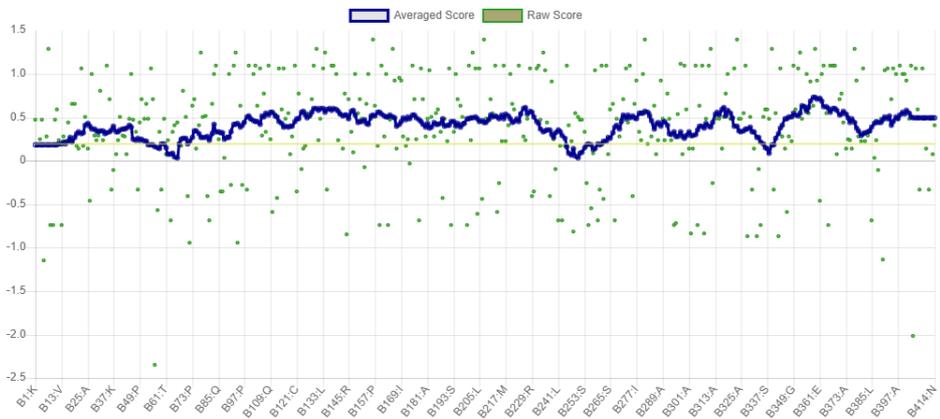
91.39% of the residues have averaged 3D-1D score ≥ 0.2 .
PASS

At least 80% of the amino acids have scored ≥ 0.2 in the 3D/1D profile.

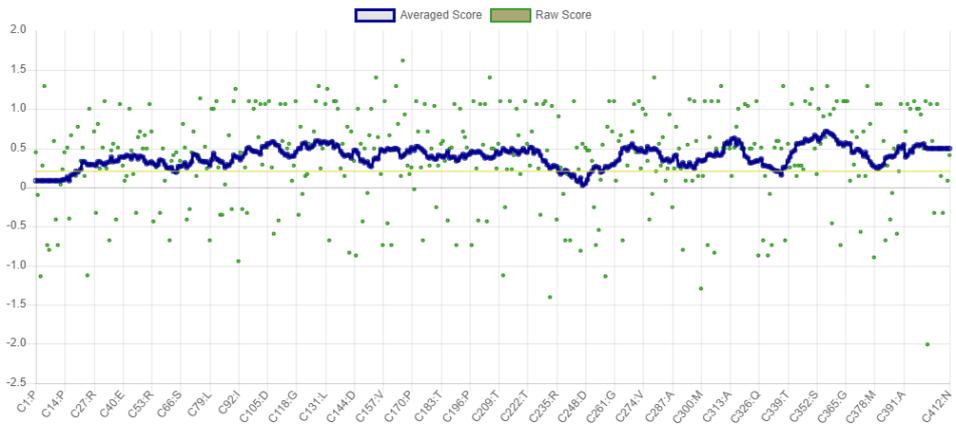
Cadeia A



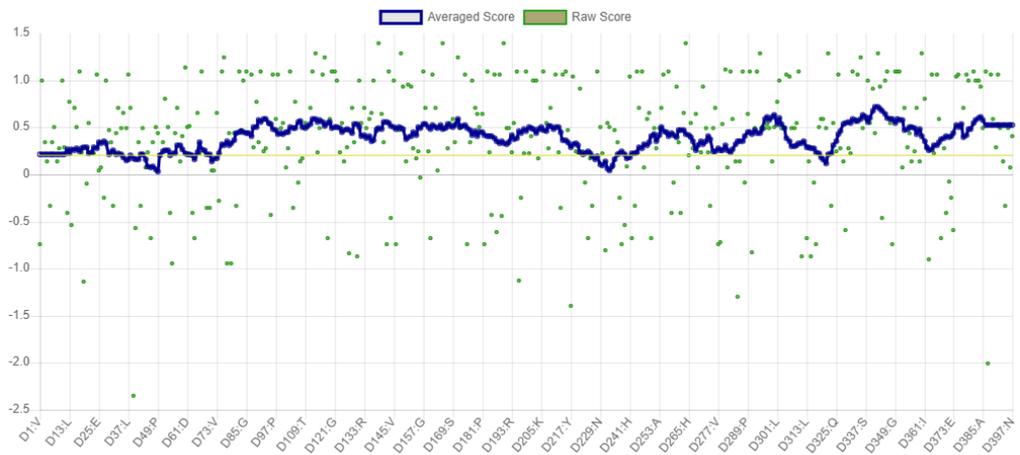
Cadeia B



Cadeia C



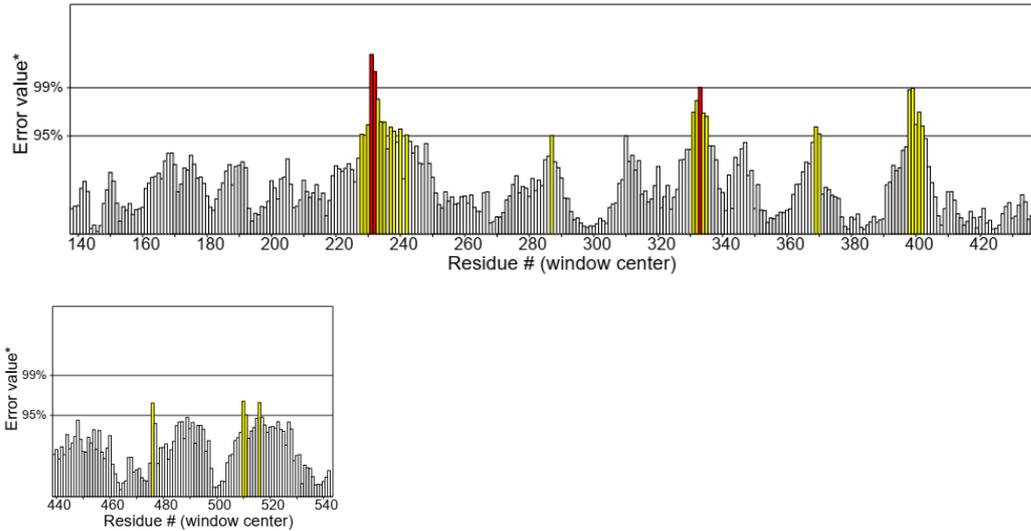
Cadeia D



ERRAT

Cadeia: A

Overall quality factor**: 92.732

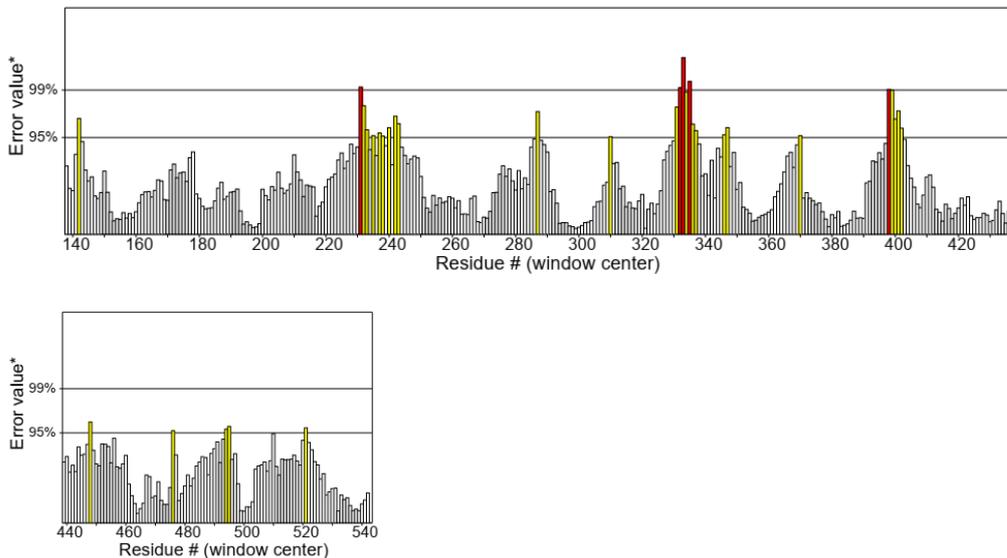


*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Cadeia: B

Overall quality factor**: 92.732

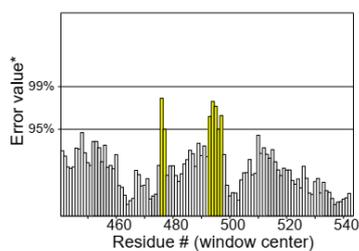
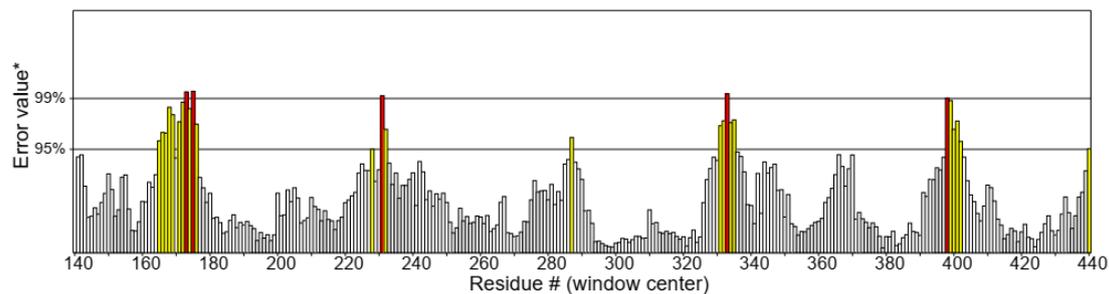


*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Cadeia: C

Overall quality factor**: 92.732

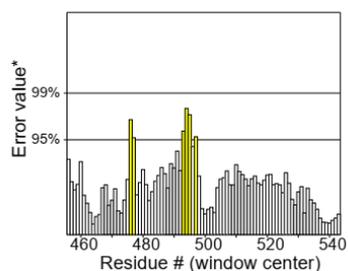
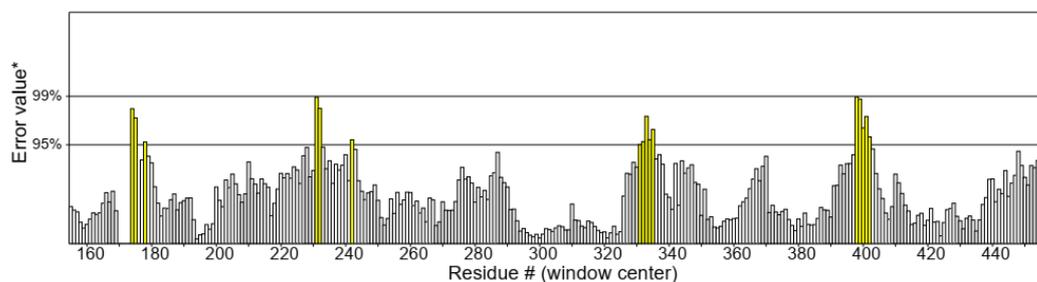


*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Cadeia: D

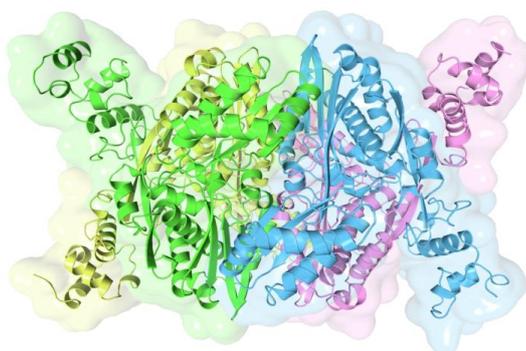
Overall quality factor**: 92.732



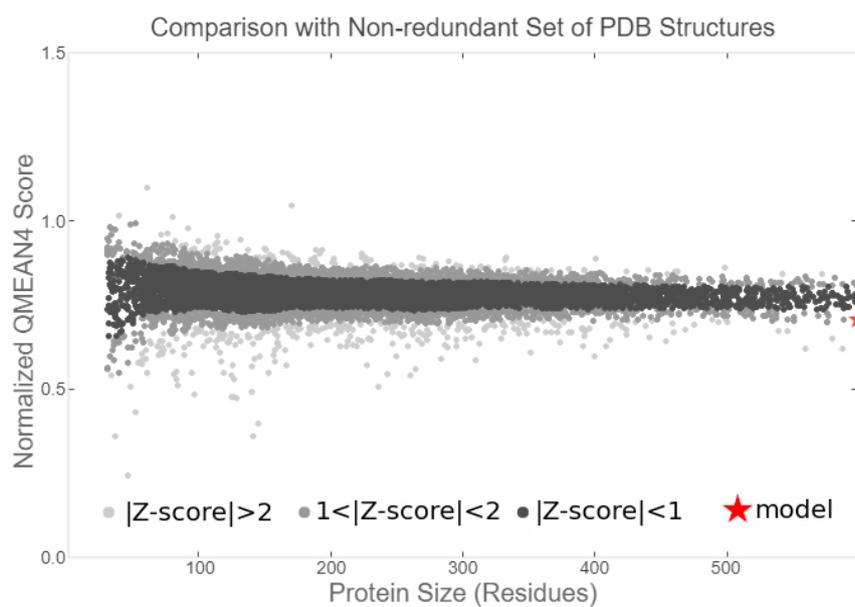
*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Avaliações da estrutura da HMG-CoA-redutase de *E. granulosus* (EgHMGCR)

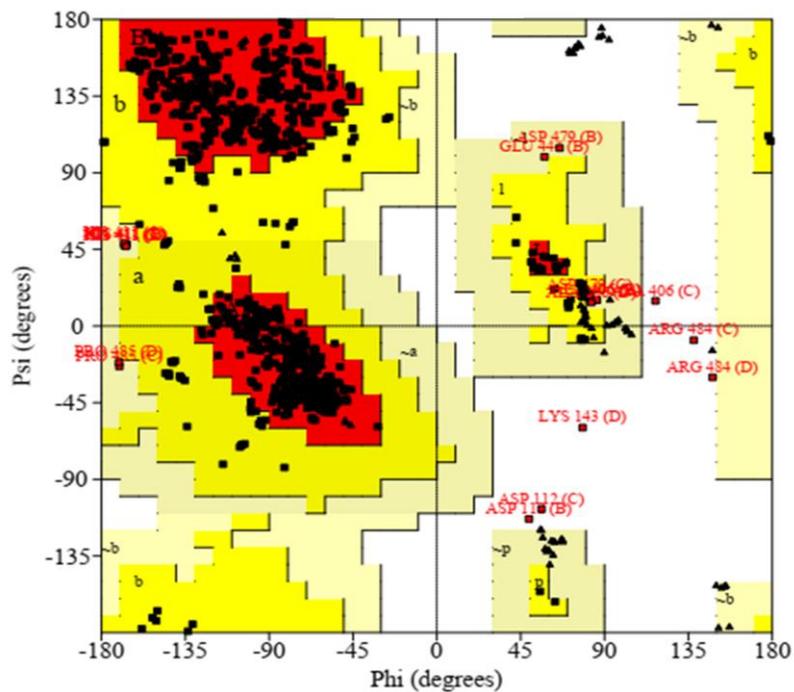


QMEAN



*QMEAN is a composite scoring function which is able to derive both global (i.e. for the entire structure) and local (i.e. per residue) absolute quality estimates on the basis of one single model. By default they are transformed into Z-scores to relate them with what we would expect from high resolution X-ray structures.

RAMACHANDRAN PLOT



Plot statistics

| | | |
|--|------|--------|
| Residues in most favoured regions [A,B,L] | 1290 | 91.2% |
| Residues in additional allowed regions [a,b,l,p] | 108 | 7.6% |
| Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p] | 10 | 0.7% |
| Residues in disallowed regions | 6 | 0.4% |
| Number of non-glycine and non-proline residues | 1414 | 100.0% |
| Number of end-residues (excl. Gly and Pro) | 5 | |
| Number of glycine residues (shown as triangles) | 132 | |
| Number of proline residues | 88 | |
| Total number of residues | 1639 | |

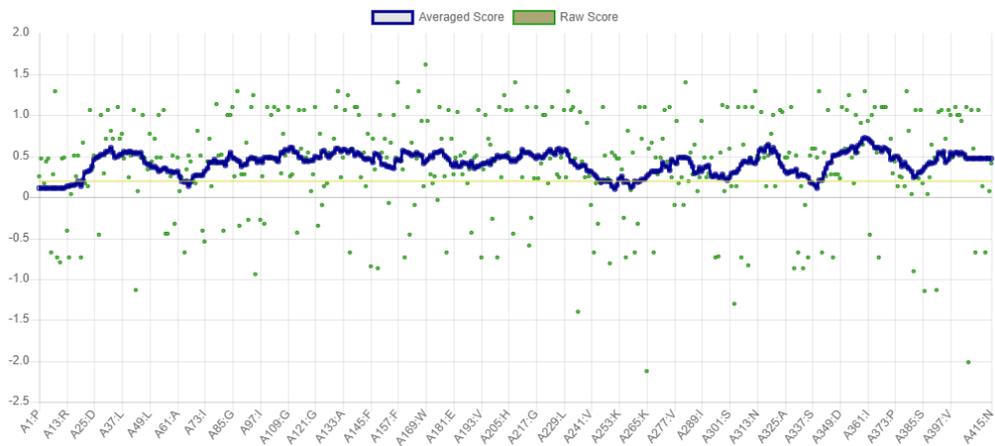
Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20% a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

VERIFY3D

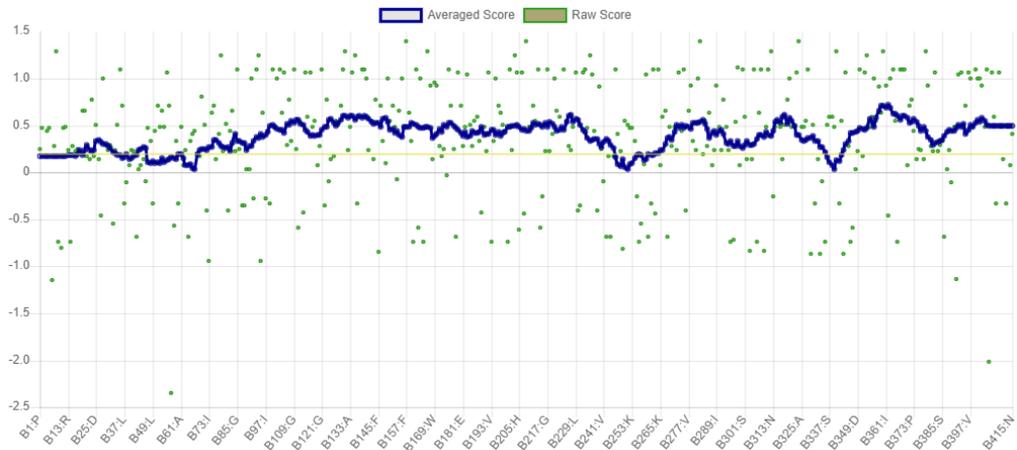
89.20% of the residues have averaged 3D-1D score ≥ 0.2 .
PASS

At least 80% of the amino acids have scored ≥ 0.2 in the 3D/1D profile.

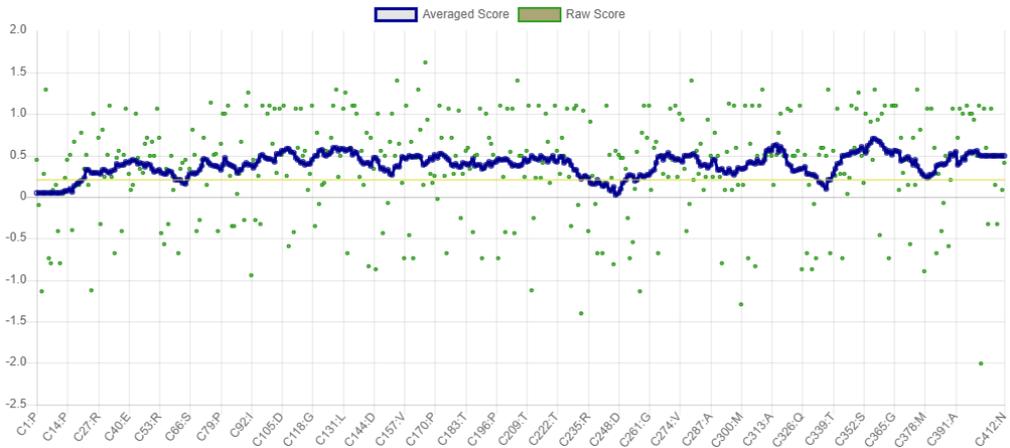
Cadeia A



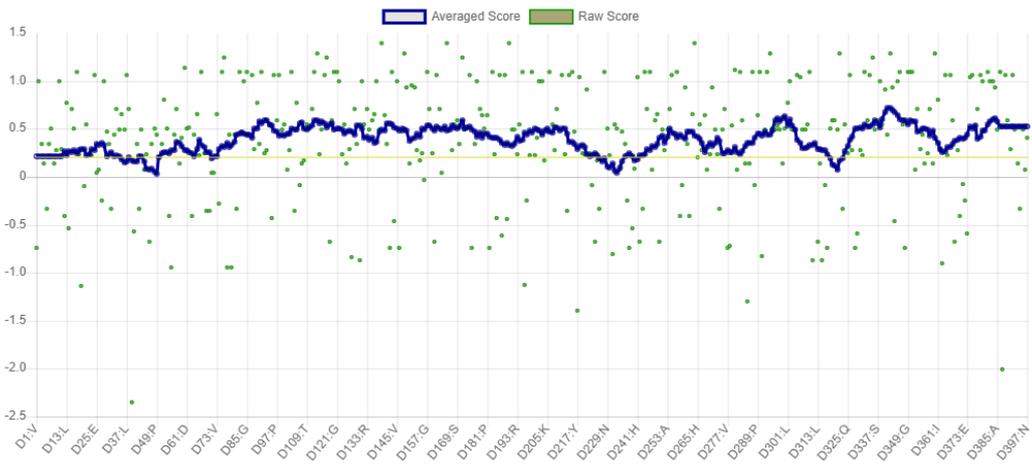
Cadeia B



Cadeia C



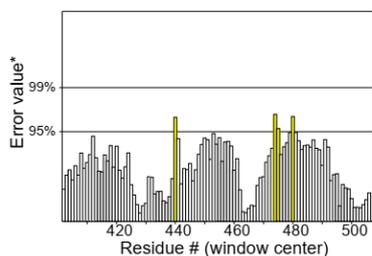
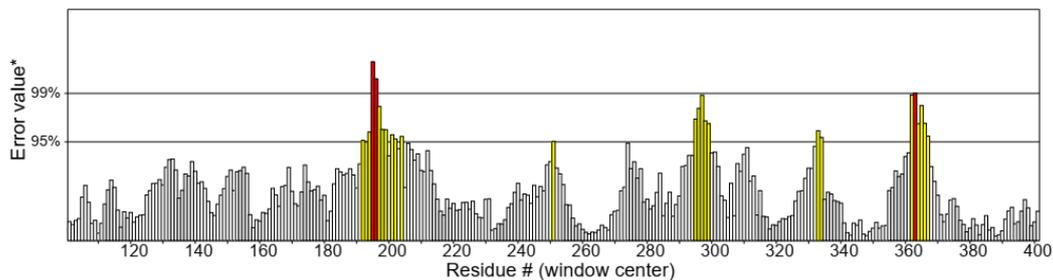
Cadeia D



ERRAT

Cadeia: A

Overall quality factor** : 92.862

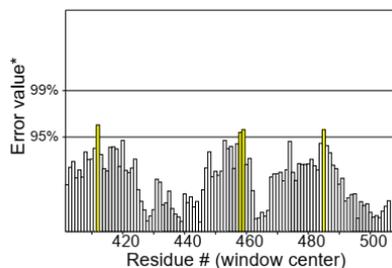
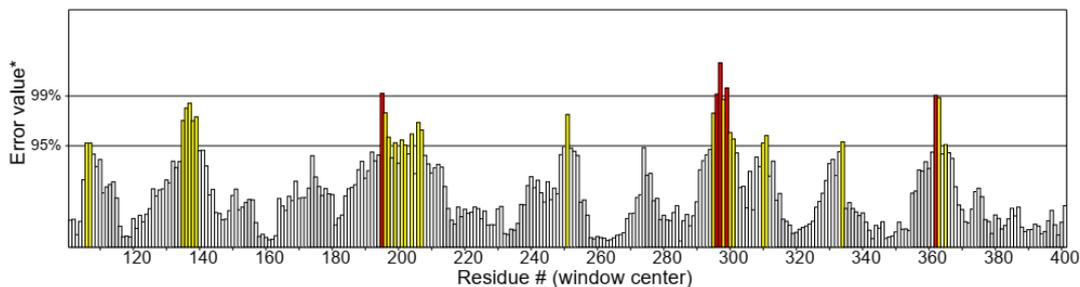


*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Cadeia: B

Overall quality factor** : 92.862

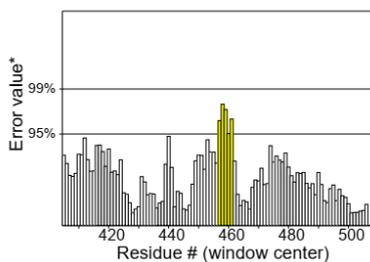
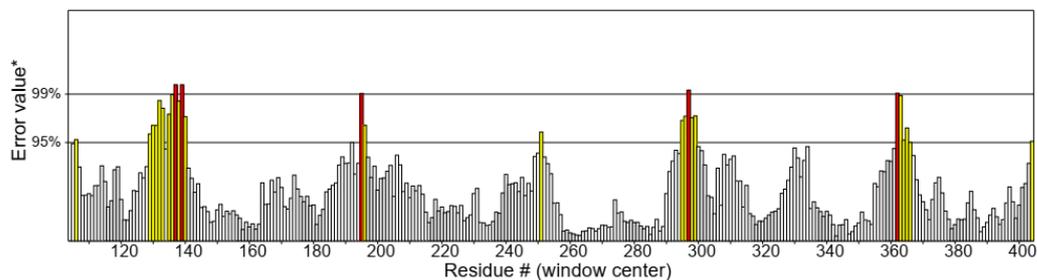


*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Cadeia: C

Overall quality factor** : 92.862

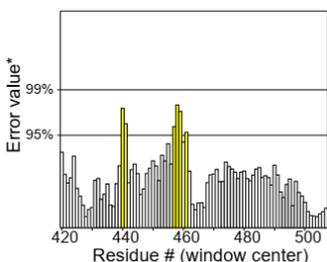
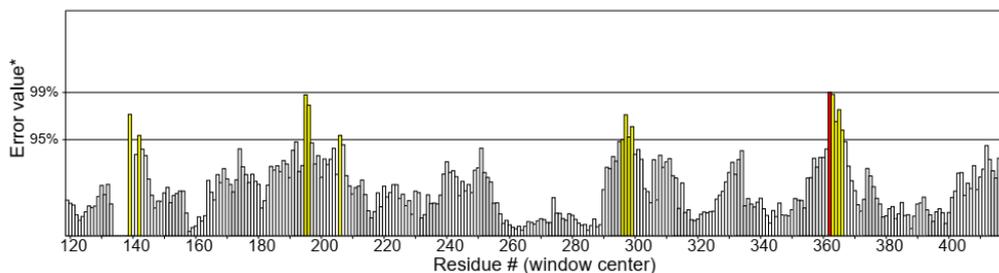


*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Cadeia: D

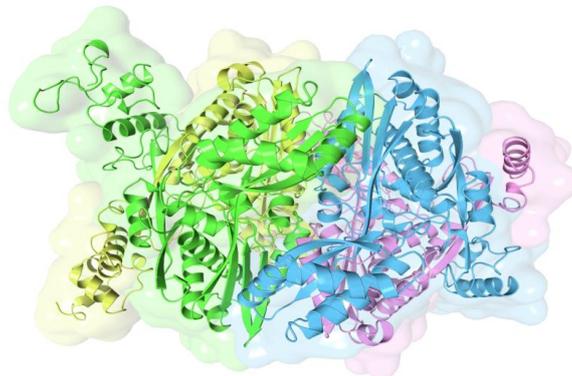
Overall quality factor** : 92.862



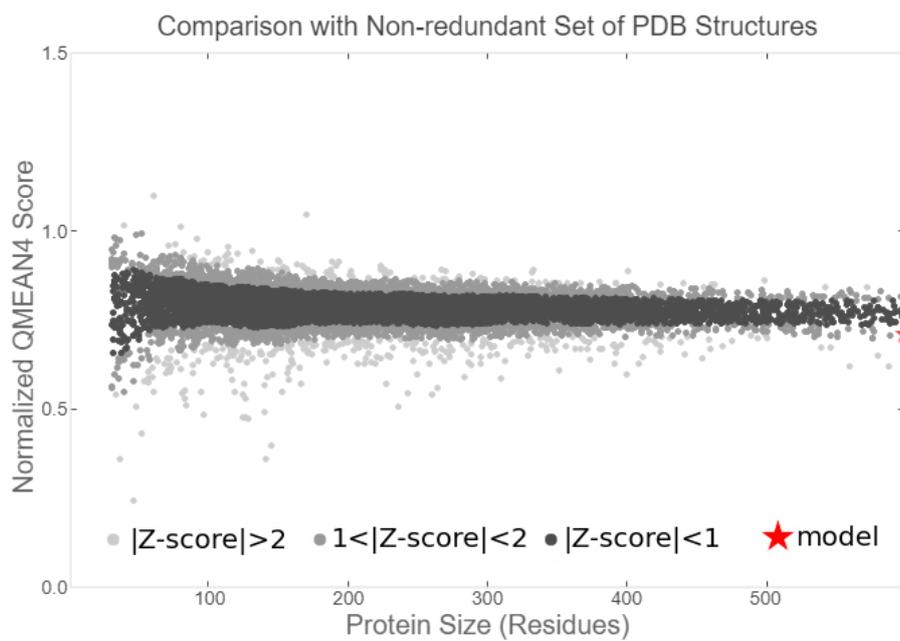
*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Avaliações da estrutura da HMG-CoA-redutase de *T. solium* (TsHMGCR)

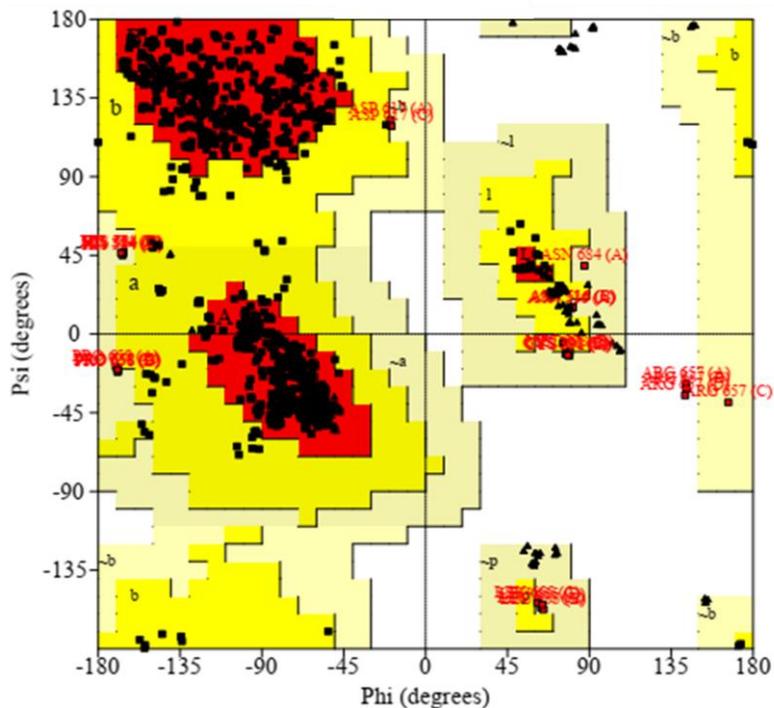


QMEAN



*QMEAN is a composite scoring function which is able to derive both global (i.e. for the entire structure) and local (i.e. per residue) absolute quality estimates on the basis of one single model. By default they are transformed into Z-scores to relate them with what we would expect from high resolution X-ray structures.

RAMACHANDRAN PLOT



Plot statistics

| | | |
|--|------|--------|
| Residues in most favoured regions [A,B,L] | 1292 | 90.4% |
| Residues in additional allowed regions [a,b,l,p] | 110 | 7.9% |
| Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p] | 9 | 1.5% |
| Residues in disallowed regions | --- | ----- |
| Number of non-glycine and non-proline residues | 1342 | 100.0% |
| Number of end-residues (excl. Gly and Pro) | 7 | |
| Number of glycine residues (shown as triangles) | 130 | |
| Number of proline residues | 83 | |
| | --- | |
| Total number of residues | 1562 | |

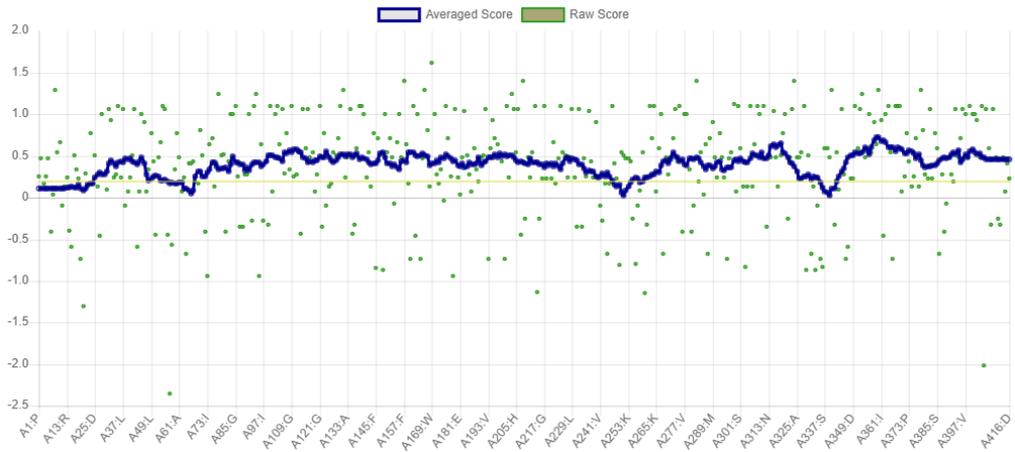
Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20% a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

VERIFY3D

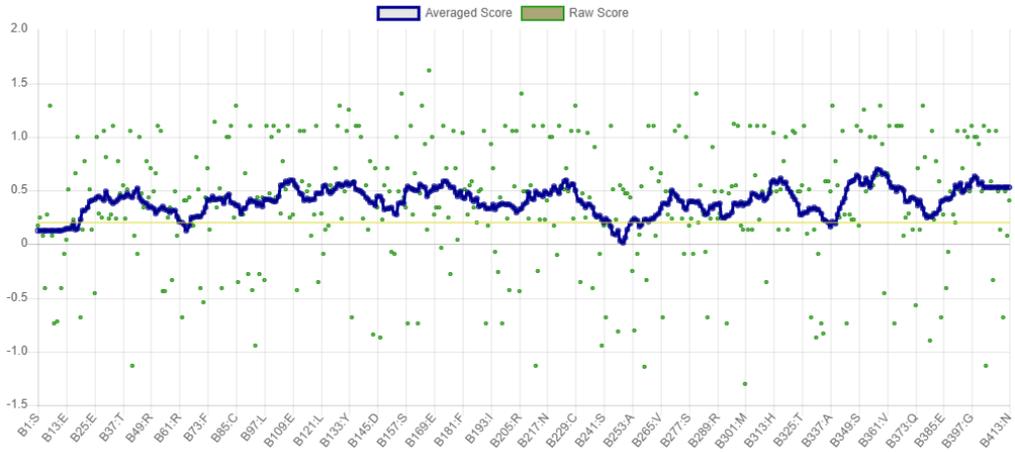
89.88% of the residues have averaged 3D-1D score ≥ 0.2 .
PASS

At least 80% of the amino acids have scored ≥ 0.2 in the 3D/1D profile.

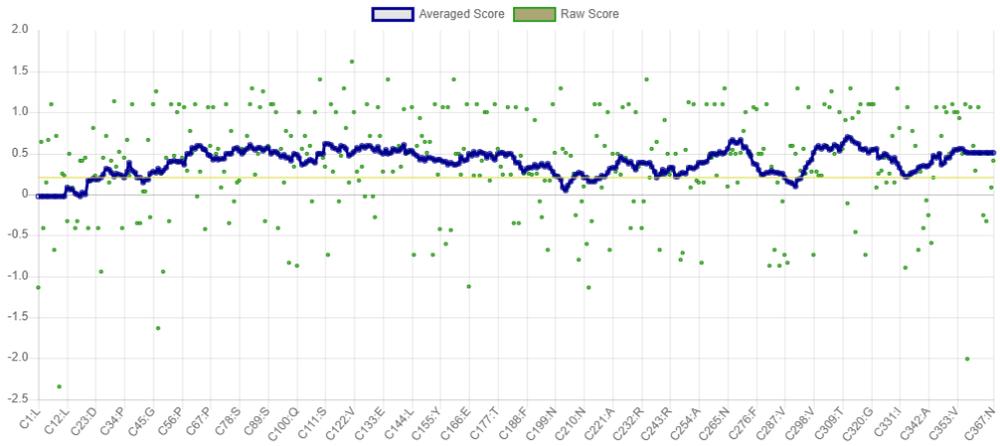
Cadeia A



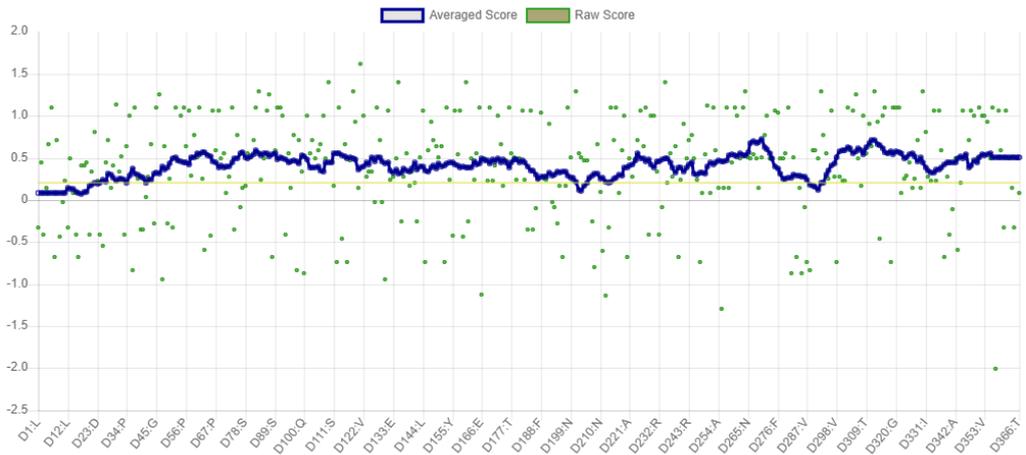
Cadeia B



Cadeia C



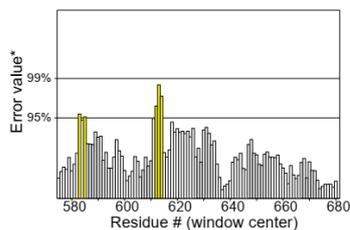
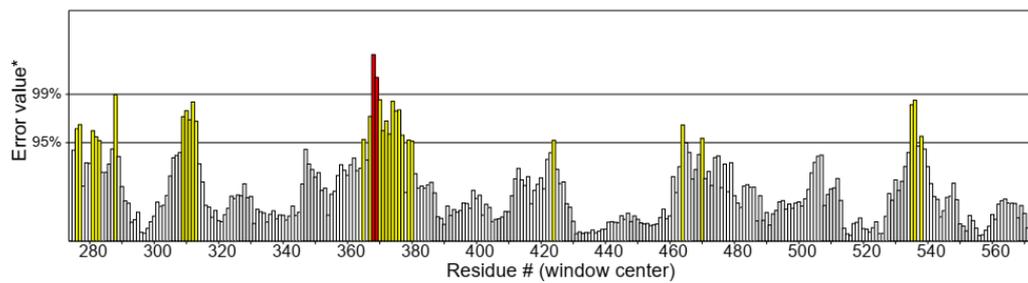
Cadeia D



ERRAT

Cadeia: A

Overall quality factor**: 92.595

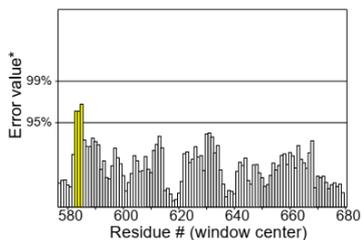
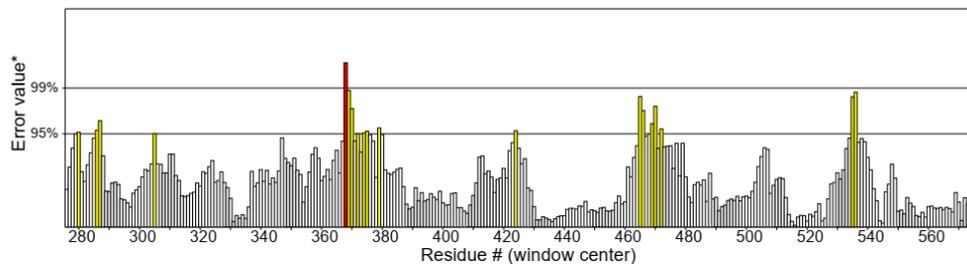


*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Cadeia: B

Overall quality factor**: 92.595

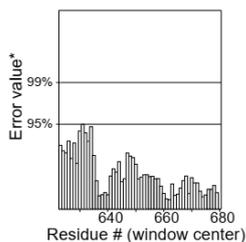
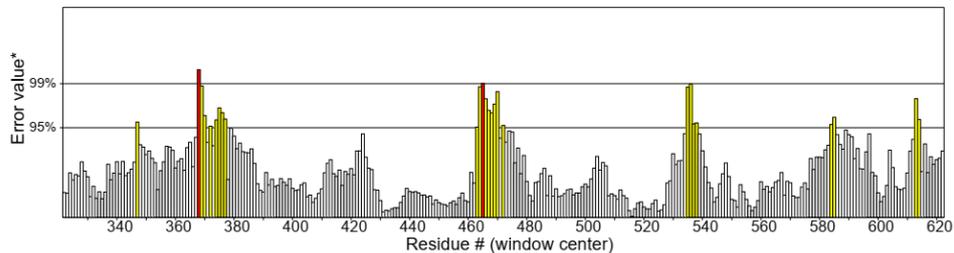


*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Cadeia: C

Overall quality factor**: 92.595

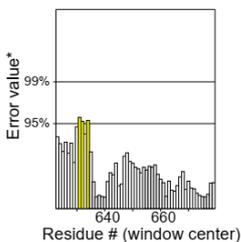
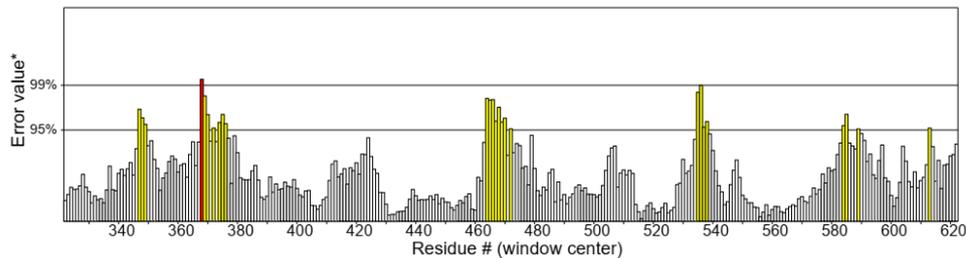


*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

Cadeia: D

Overall quality factor**: 92.595



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.

**Expressed the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structure generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3 Å) the average overall quality factor is around 91%.

ANEXO
CURRICULUM VITAE

Guedes, M. M.

Dados Pessoais

Nome: Marina Monteiro Guedes

Local de nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil e 12/05/1994

Endereço profissional: CBiot/UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, prédio 43421, Sala 210, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Telefone profissional: (51) 99217 8047

E-mail: marina_monteiro.guedes@yahoo.com.br

Formação

2019 – Presente Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Título: Avaliação da HMG-CoA-redutase como alvo para o reposicionamento de fármacos como novos anti-helmínticos.

Orientador: Prof. Henrique Bunselmeyer Ferreira.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES.

2014 – 2019 Graduação em Ciências Biológica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Título: Modelagem estrutural e estudos de docking da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase e análise *in vitro* do efeito da sinvastatina na viabilidade de *Mesocestoides corti*.

Orientador: Arnaldo Zaha.

Bolsista do (a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq.

Formação complementar

2021 – Dinâmica Molecular Básica. (Carga horária: 10h). Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC/MCTI, Brasil.

2021 – Métodos de Docking Receptor-Ligante e Virtual Screening. (Carga horária: 10h). Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC/MCTI, Brasil.

2021 – Predição de Estruturas de Proteínas. (Carga horária: 10h). Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC/MCTI, Brasil.

2018 – V Curso de Inverno em Microbiologia e Biologia Molecular Aplicada. (Carga horária: 40h). Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II (ICB-USP), Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2016 – Extensão Universitária em Sequenciamento de DNA: Perspectivas na Biotecnologia 3ª Edição. (Carga horária: 20h). Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Estágios

2018 – 2019 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20h
Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos (Centro de Biotecnologia/ UFRGS)
Orientador (a): Arnaldo Zaha

2019 Vínculo: Estágio Curricular Obrigatório, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 360h
Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco (Instituto Carlos Chagas/ Fiocruz Paraná)
Supervisor (a): Marco Augusto Stimamiglio

2015 – 2017 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista de Extensão/PROEXT, Carga horária: 20h
Laboratório de Hemostasia (UFRGS)
Orientador (a): Eliane Bandinelli

Resumos e trabalhos apresentados em congresso

Guedes, Marina Monteiro; Camargo de Lima, Jeferson; Zaha, Arnaldo. Modelagem estrutural e estudos de *docking* da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase e análise *in vitro* do efeito da sinvastatina na viabilidade de *Mesocestoides corti*. 2019. (Apresentação de Trabalho/Outra). SIC2019 - XXXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Guedes, Marina Monteiro; Camargo de Lima, Jeferson; Zaha, Arnaldo. Análise da sequência da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase de *Echinococcus granulosus*, possível enzima alvo no tratamento terapêutico da Hidatidose Cística. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra). SIC2018 - XXX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Guedes, Marina Monteiro; Bandinelli, Eliane. Coagulopatias Heditárias: Acompanhamento Laboratorial de Pacientes da Rede Pública de Saúde. 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra). XVIII Salão de Extensão da UFRGS, Porto Alegre, Brasil.