

## Modelagem e análise molecular da enzima Adenosina Desaminase (ADA) do parasito *Schistosoma mansoni*

### Danrlei Leandro Kayser

Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), *campus* União da Vitória-PR.

Contato: danrleikayser@gmail.com

### Cassiano Vicente de Lima

Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), *campus* União da Vitória - PR.

Contato: cassianovdl@gmail.com

### Carla Andreia Lorscheider

Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), *campus* União da Vitória-PR.

Contato: profcarlacb@gmail.com

### Larissa Romanello

Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), Unidade Ituiutaba-MG.

Contato: larissa.romanello@uemg.br

**Resumo:** A esquistossomose é uma doença parasitária provocada pelo helminto *Schistosoma mansoni* e afeta cerca de 240 milhões de pessoas em todo mundo. O tratamento da doença atualmente dá-se pela administração de apenas um fármaco, o praziquantel. Entretanto, pelo seu uso em massa, diversos casos de resistência do parasito ao fármaco tem sido reportados. Diferente de seu hospedeiro humano, o *S. mansoni* não possui a via de síntese de purinas, dependendo exclusivamente da via de salvção de purinas para o suprimento dessas bases. Deste modo, esta via tem sido citada como alvo potencial para o desenvolvimento de novos fármacos contra a esquistossomose. A adenosina desaminase (ADA) é uma das enzimas dessa via, convertendo a adenosina em inosina e hipoxantina. Uma vez que a estrutura tridimensional dessa enzima não foi resolvida experimentalmente, a modelagem molecular comparativa possibilitou sua análise estrutural e bioquímica. O estudo foi desenvolvido em etapas: seleção do molde, alinhamento alvo-molde, construção do modelo molecular, avaliação e validação do modelo, análises moleculares. As avaliações do modelo obtido apresentaram qualidade satisfatória e, em comparação com ADA humana foi possível observar substituições de resíduos de aminoácidos no sítio ativo que suportam a investigação da enzima como alvo potencial para desenvolvimento de fármacos através de experimentos de docagem, cinética enzimática e cristalografia de proteínas.

**Palavras-chave:** Esquistossomose; *Schistosoma mansoni*; Adenosina desaminase.

### Molecular modelling and analysis of Adenosine Deaminase (ADA) from *Schistosoma mansoni* parasite

**Abstract:** Schistosomiasis is a parasitic disease caused by the helminth *Schistosoma mansoni* and affects approximately 240 million people worldwide. Currently, the treatment for this disease is based on the administration of only one drug, praziquantel. However, due to its mass usage, several cases of parasite resistance to the drug have been reported. Unlike its human host, *S. mansoni* lacks the purine synthesis pathway, depending solely on the salvage pathway for the supply of these bases. Therefore, this pathway

has been mentioned as a potential target for the development of new drugs against schistosomiasis. Adenosine deaminase (ADA) is one of the enzymes in this pathway, converting adenosine into inosine and hypoxanthine. Since the three-dimensional structure of this enzyme has not been experimentally resolved, comparative molecular modeling has enabled molecular and biochemical analysis. The study was developed in stages: template selection, target-template alignment, construction of the molecular model, model evaluation and validation, and molecular analyses. The evaluations of the obtained model showed satisfactory quality, and compared to human ADA, it was possible to observe substitutions of amino acid residues in the active site that support the investigation of the enzyme as a potential target for drug development through docking experiments, enzymatic kinetics, and protein crystallography.

**Key-words:** Schistosomiasis; *Schistosoma mansoni*; adenosine deaminase.

### Como citar este artigo:

KAYSER, D.L.; DE LIMA, C.V.; LORSCHIEDER, C.A.; ROMANELLO, L. Modelagem e análise molecular da enzima Adenosina Desaminase (ADA) do parasito *Schistosoma mansoni*. **Luminária**, União da Vitória, v.25, n.02, p. 25 – 36, 2023.

## INTRODUÇÃO

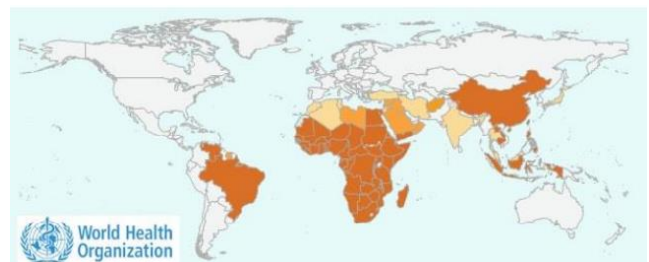
A esquistossomose, conhecida popularmente como barriga-d'água, consiste em uma doença parasitária crônica importante no contexto da saúde pública mundial e brasileira. Diversas áreas no Brasil são endêmicas para a doença, constituindo importante causa de morbidade e mortalidade da população, especialmente em situação de vulnerabilidade social (SOUZA et al., 2011).

Devido a sua relação com a condição socioeconômica e de vulnerabilidade social, a esquistossomose é umas das principais doenças negligenciadas no mundo. As doenças negligenciadas consistem em um grupo de doenças tropicais endêmicas, especialmente entre as populações pobres da África, Ásia e América Latina, que juntas, causam entre 500 mil e 1 milhão de óbitos anualmente (VALVERDE, 2013; BRASIL, 2014; WHO, 2019).

O precário acesso a água tratada e a falta de saneamento leva, por muitas vezes, à utilização de águas naturais, contaminadas com a forma transmissível do parasito, para o exercício da agricultura, trabalho doméstico, lazer e consumo, o que proporciona uma rápida expansão da doença nessas áreas (PARANÁ, 2019).

O *Schistosoma mansoni* é o parasito responsável pela esquistossomose, que afeta cerca de 240 milhões de pessoas em todo o mundo e coloca em risco mais de 700 milhões que ficam suscetíveis à doença por viverem em

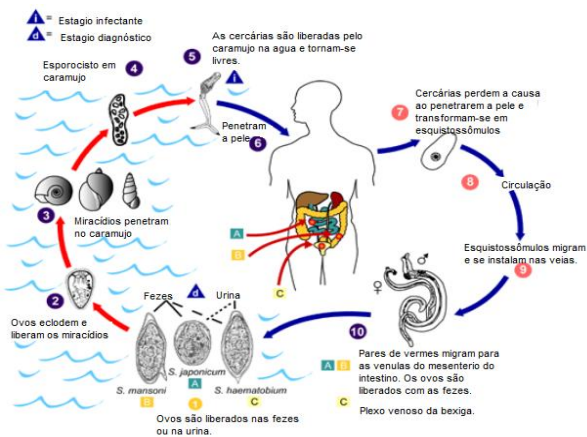
áreas endêmicas (Figura 1). A infecção prevalece em áreas tropicais e subtropicais, em comunidades pobres sem água potável que não possuem saneamento adequado (WHO, 2019).



**Figura 1.** Países endêmicos a esquistossomose.  
**Fonte:** <https://www.who.int/.sqema>

O gênero *Schistosoma* compõe-se por platelmintos trematódeos, dioicos, com diferentes estágios de desenvolvimento, dentre eles vermes adultos, ovos, miracídeos, esporocistos, cercárias e esquistossômulos. O *Schistosoma mansoni* é a única espécie do gênero descrita no Brasil, devido a inexistência de moluscos, hospedeiros intermediários, suscetíveis aos demais helmintos (SOUZA et al., 2011).

O ciclo de vida de *S. mansoni* (Figura 2) se alterna entre dois hospedeiros distintos, o caramujo do gênero *Biomphalaria* onde ocorre a reprodução assexuada e hospedeiro definitivo, o homem onde ocorre a fase de reprodução sexuada (PESSOA, 1977; CDC, 2023).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *Shistosoma mansoni*.  
Fonte: Adaptado de [www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html](http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html)

A infecção tem início quando o hospedeiro definitivo tem contato com a água contaminada com cercárias, liberadas pelo caramujo. As cercárias penetram na pele do hospedeiro e se transformam em vermes imaturos que migram para o sistema sanguíneo ou linfático, chegando até os pulmões, onde passam por remodelações para a vida parasitária, em seguida, migram para o sistema digestivo e atingem a maturidade sexual. Os ovos são eliminados nas fezes e eclodem em contato com a água liberando o miracídio, que penetra no caramujo transformando-se em cercárias, reiniciando o ciclo (PESSOA, 1977; CDC, 2023).

A redução da incidência de casos de esquistossomose requer a detecção precoce e tratamento imediato de todos os portadores para evitar que a ação patogênica acumulativa dos ovos do *S. mansoni* provoque alterações nos órgãos afetados (BRASIL, 2014).

Os portadores da doença, na fase aguda ou crônica, e os casos de formas ectópicas, geralmente chegam por demanda passiva aos serviços de saúde e devem ter acesso aos cuidados médicos e aos diagnósticos na rede de atenção básica e serviços especializados. A detecção e tratamento dos portadores objetivam também reduzir a expansão geográfica da esquistossomose. Este tratamento baseia-se, mundialmente, na administração de um único fármaco, o praziquantel (PZQ) (BRASIL, 2014).

Diversos estudos demonstram que o praziquantel apresenta eficácia que varia entre 60

a 90% de cura (VITORINO et al., 2012). Entretanto, pelo seu uso unificado, prolongado e em massa, diversos casos de resistência ao fármaco têm sido reportados desde os anos 90 (FALLON et al., 1994). Neste caso, surge a necessidade de busca por novos alvos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da esquistossomose.

A produção de ovos é o aspecto mais significativo do parasitismo e a maior causa da patologia da esquistossomose. A estimativa da produção de ovos fertilizados pelo parasita é de centenas de ovos por dia. Acredita-se que esta fecundidade persista por anos, representando um exemplo notável de capacidade biosintética altamente especializada, que obviamente requer um ativo metabolismo de nucleotídeos de purina, tanto como fonte de energia (ATP) como para o suprimento de bases de purina nas sínteses de DNA e RNA.

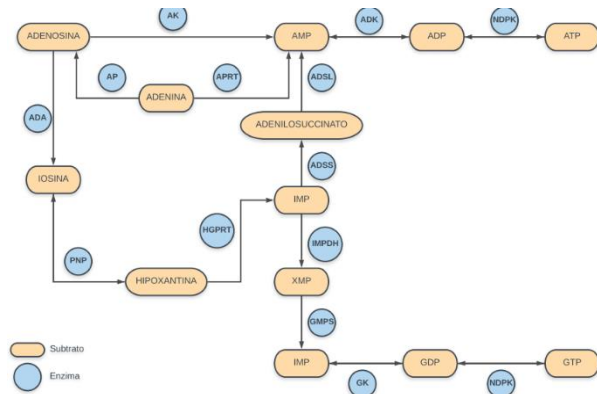
Os organismos possuem basicamente duas vias para biossíntese de nucleotídeos, uma via conhecida como *via de novo*, que sintetiza novos nucleotídeos a partir de elementos essenciais simples, a outra via compreende a *via de salvação*, que reutiliza bases nitrogenadas resultantes das quebras metabólicas de nucleotídeos (NELSON; COX, 2020).

O parasito *S. mansoni*, diferente de seu hospedeiro, dependente totalmente da *via de salvação* para o suprimento das bases purínicas em seu metabolismo, já que este não possui a *via de novo*. A alta necessidade de nucleotídeos e conversão em bases purinas pela via de salvação são os motivos pelo qual o parasita aloja-se no intestino do hospedeiro durante o processo reprodutivo (PEREIRA, 2003).

Durante o processo metabólico da via de salvação de bases purinas (figura 3) o *S. mansoni* obtém AMP em uma via direta com a ação enzimática da *adenosina kinase*, (AK) ou de uma forma indireta, mais utilizada, sem a participação dessa enzima (Adenosina → Inosina → Hipoxantina → IMP → AMP) (STEGMAN et al., 1973).

Na via de salvação de purinas as enzimas adenosina desaminase (ADA) e purina nucleosídeofosforilase (PNP) atuam convertendo mais da metade da adenosina para inosina e hipoxantina. Uma parte da adenosina é clivada em

adenina e posteriormente ocorre a formação de Adenosina monofosfato (AMP) pela fosforibosilação da adenina (CRABTREE; SENFT, 1977).



**Figura 3.** Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos de *Schistosoma mansoni*.  
Fonte: Adaptado de Romanello (2016).

Por tratar-se de uma via metabólica diferencial entre hospedeiro e parasito, esta via tem sido citada como alvo potencial para o desenvolvimento de novos fármacos contra a esquistossomose. Estudos estruturais, bioquímicos e imunológicos das enzimas desta e outras vias de *S. mansoni* têm contribuído para a investigação da proposta (FATTORI et al, 2023; FRAGELLI, et al, 2023; KZIOZEK et al, 2021; LIMA et al, 2020; KRIZINSKI et al, 2020; PEREIRA et al, 2003; PEREIRA et al, 2005; ROMANELLO et al, 2013; ROMANELLO et al, 2017; ROMANELLO, et al 2019; SERRÃO et al 2017, ZERAIK et al, 2017; SCORTECCI et al, 2017; TORINI et al, 2016; TORINI et al, 2019; TORINI et al, 2018; DA SILVA NETO et al, 2016; NERIS et al, 2013; NERIS et al, 2014; MARQUES et al, 2012; CAGNAZZO et al, 2020). Entretanto, nesta via, a enzima ADA, responsável pela conversão de adenosina em inosina, ainda não foi resolvida experimentalmente e nem investigada, como as enzimas AK (ROMANELLO, 2013; KZIOZEK, 2021), PNP (PEREIRA, 2003; PEREIRA, 2005, TORINI 2018), HGPRT (ROMANELLO, 2019; LIMA, 2020), ADSL (ROMANELLO, 2017), NDPK (TORINI, 2019) e ADSS (KRIZINSKI, 2020). Nesse caso,

técnicas de modelagem molecular foram empregadas com o objetivo de fornecer informações estruturais e bioquímicas sobre a enzima de forma complementar os estudos da via metabólica.

## METODOLOGIA

Os principais métodos de modelagem de estruturas 3D de proteínas na bioinformática são: Modelagem Comparativa; Predição de Enovelamento de Proteínas e Predição por Primeiros Princípios. A modelagem comparativa ou modelagem por homologia utiliza como molde a estrutura 3D de outra proteína de referência, que já tenha sido resolvida experimentalmente e com coordenadas cartesianas depositadas em banco de dados de estruturas.

A modelagem por homologia tem sido frequentemente utilizada e seu limite de predição está relacionado com o grau de similaridade entre as estruturas alvo e molde. A Predição de Enovelamento de Proteínas busca ajustar a estrutura da proteína a ser estudada aos tipos de enovelamentos de proteínas conhecidas já registradas e depositadas em bibliotecas (SALI et al., 1993).

O processo de modelagem comparativa utilizado no trabalho, é escolhido quando existe uma relação de homologia entre a sequência da proteína alvo e pelo menos uma estrutura 3D conhecida a ser estabelecida. Esta técnica computacional é baseada na hipótese que estruturas terciárias de duas proteínas possam ser similares se suas sequências primárias sejam relacionadas (CANDURI et al., 2003).

Para a modelagem de ADA, utilizou-se como molde a proteína 6IV5 com uma identidade de 35,38%, disposta no PDB. Essa técnica foi escolhida pois, em caso de similaridades entre duas ou mais proteínas a nível de sequência, a analogia estrutural pode ser presumida computacionalmente por meio de diferentes técnicas e *softwares*

Para a obtenção do candidato à proteína alvo, foi utilizada a ferramenta *web Swiss-Model*, que encontra regiões de semelhança entre sequências biológicas, comparando sequências de aminoácidos em bases de dados fornece o cálculo de identidade sequencial e cobertura.

Para obtenção do modelo utilizou-se do

servidor online *Swiss-Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>) que possibilita a modelagem comparativa de estruturas proteicas tridimensionais. Para isso é fornecido um alinhamento de uma sequência de aminoácidos da enzima a ser modelada com estruturas relacionadas conhecidas e o servidor automaticamente calcula um modelo tridimensional, implementando uma modelagem da estrutura protéica pela satisfação de restrições espaciais.

O modelo gerado foi validado no site PDBsum que fornece análises sobre a qualidade do modelo e disposição dos aminoácidos. Uma vez validado o modelo, executou-se uma análise comparativa de ADA humana e do modelo de ADA de *S. mansoni* através do programa PyMOL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para obtenção da proteína molde utilizou-se a ferramenta *web* BLAST, que identifica regiões de semelhança entre sequências biológicas em estruturas já resolvidas dispostas no PDB. A ferramenta compara as sequências de aminoácidos nas bases de dados do PDB e calcula a significância com a proteína alvo. Ao executar a ferramenta obteve-se como resultado a estrutura proteica com código PDB 6IV5 com relação de identidade sequencial de 35,38% e cobertura de 96%. Mediante resultado satisfatório de relação, escolheu-se a estrutura 6IV5 de *Arabidopsis thaliana*, uma planta pequena nativa da Eurásia e África, para a modelagem por homologia.

O alinhamento das sequencias por meio da ferramenta T-Coffee das sequencias de Adenosina Desaminase (ADA) com a sequência de proteína alvo, pode ser visualizado na Figura 5. O algoritmo aponta as sequencias em vermelho que são consideradas boas, as sequencias em amarelo, são consideradas medianas e as sequencias em azul, são consideradas ruins. A linha cons refere-se ao índice de conservação dos aminoácidos, onde a representação por “\*” refere-se a conservação total, ou seja, são os mesmos aminoácidos; a representação por “:” indica uma similaridade média, ou seja, são aminoácidos com características semelhantes; a representação por

meio de “.” ou sem nenhum caractere remete a uma baixa similaridade.



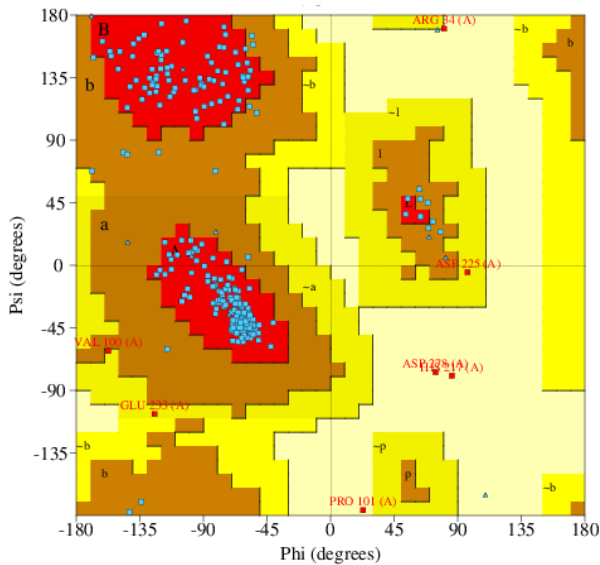
Figura 5. Alinhamento de sequencias utilizando a ferramenta T-Coffee.

Após análise e avaliação do alinhamento, executou-se o servidor web Swiss-Model para realizar a modelagem molecular entre proteína alvo e proteína molde. O resultado da modelagem foi validado no servidor PDB sum que propiciou a execução do software PROCHEK para avaliação do modelo e obtenção do gráfico de Ramachandran, conhecidamente utilizado para análise de ângulos phi e psi dos aminoácidos da enzima analisada. Pode-se observar no gráfico da figura 6 que 281 resíduos (91,2%) encontram-se em regiões favoráveis; 21 resíduos (6,8%) em regiões e permitidas; 3 resíduos (1%) em regiões generosamente permitidas e outros 3 resíduos (1%) encontram-se em regiões não permitidas.

Modelos que possuem um índice acima de 90% de resíduos em regiões favoráveis são considerados bons e confiáveis para análises estruturais, qualificando assim, o modelo da estrutura tridimensional da enzima ADA de *S. mansoni* obtido.

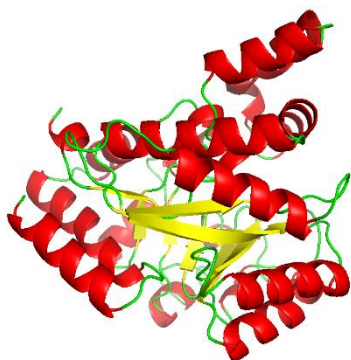
O modelo também foi avaliado através da ferramenta Swiss-Model, e apresentou uma pontuação de 0,72 na estimativa GMQE (Global Model Quality Estimation) onde números mais altos (entre 0 e 1) representam maior confiabilidade. Em análise QMEAN obteve-se um resultado de -2,53, considerando-o de boa qualidade, uma vez que, modelos com pontuação menor ou igual a -4,0 são indicativos de modelos

com baixa qualidade (Swiss-Model. 2020).



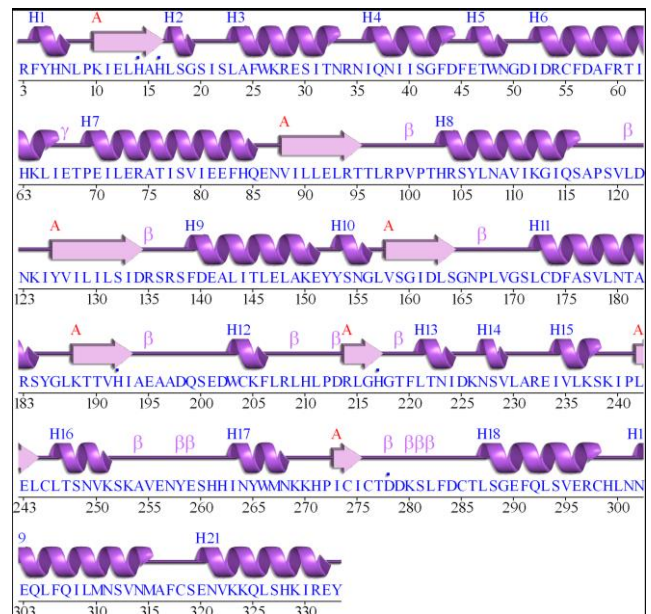
**Figura 6.** Gráfico de Ramachandran, obtido através do software PDBsum representando as distribuições dos ângulos phi e psi para ADA. As regiões representadas na cor vermelha (A, B, L) representam as regiões mais favoráveis; as regiões em marrom (a, b, l, p) representam as regiões permitidas; as regiões em amarelo escuro (~a, ~b, ~l, ~p) correspondem as regiões generosamente permitidas e as regiões amarelo claro correspondem as regiões não permitidas.

A Figura 7 representa a estrutura tridimensional de ADA de *S. mansoni* obtida através do servidor SwissModel e colorida pelo software PyMOL destacando as alfas hélices em vermelho nas regiões mais externas da enzima, folha beta em amarelo no centro e os loops conectores em verde.



**Figura 7.** Estrutura tridimensional de ADA do parasito *S. mansoni*, obtida por meio do software PyMOL. As estruturas em vermelho representam as  $\alpha$ -hélices, as estruturas em amarelo representam as folhas-  $\beta$  e as alças estão representadas em verde.

O modelo de ADA analisado é estruturalmente formado por 1 folha beta, 8 fitas beta, 21 alfas hélices, 29 interações hélice-hélice, 15 loops, estas estruturas podem ser observadas na figura 08 que apresenta a relação da sequência de aminoácidos com as estruturas secundárias formadas.

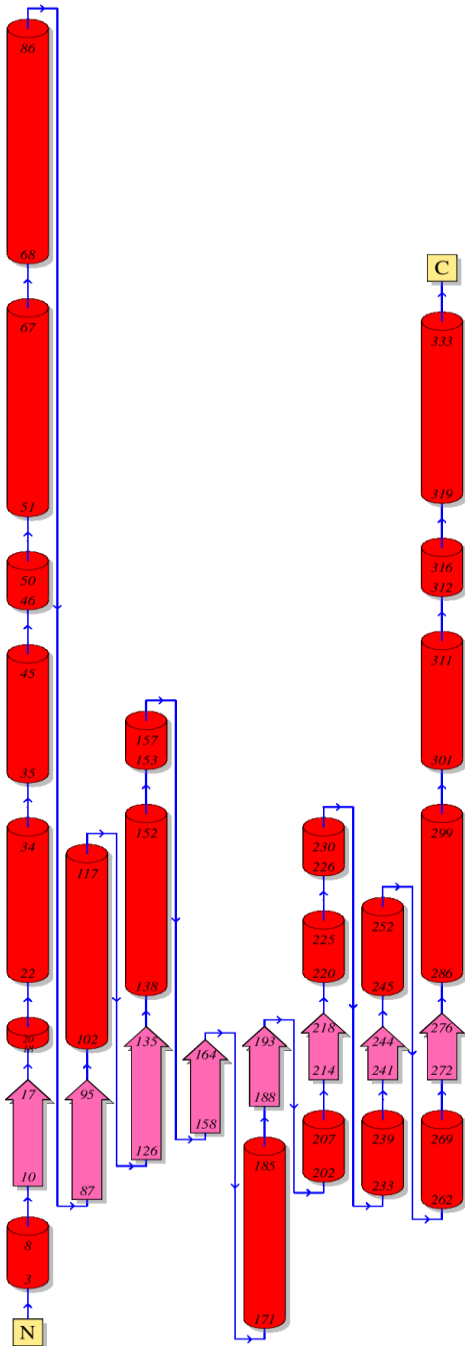


**Figura 8.** Estrutura secundária de ADA gerado utilizando o BPSum. As fitas  $\beta$  são representadas por setas, as  $\alpha$ -hélices por espirais com a respectiva numeração em cima (H1, H2, H3...H21), as 2 folhas  $\beta$  são classificadas como A, tendo a letra disposta acima das fitas identificando a qual folha pertencem.

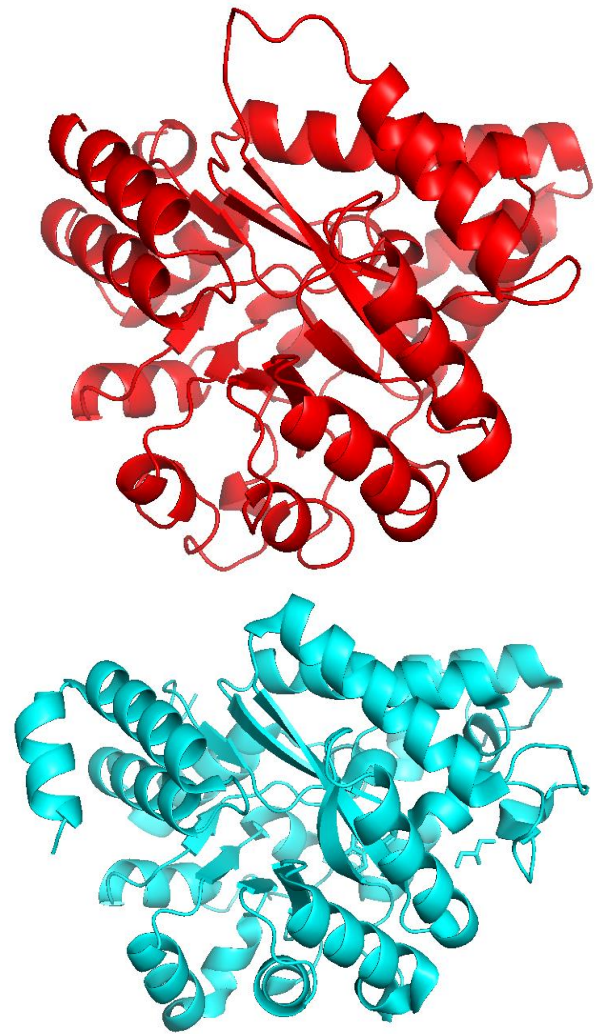
A figura 9, apresenta um diagrama de topologia representando os elementos da estrutura secundária, gerados através do servidor PDBsum. É possível observar em um gráfico de duas dimensões a topologia do modelo, sendo representado as folhas-  $\beta$  e as  $\alpha$ -hélices, bem como as posições do N-terminal e C-terminal.

Constatada a confiabilidade do modelo, sua análise de estrutura secundária, enovelamento e de topologia, em execução ao software PyMOL, utilizou-se o modelo gerado para análise estrutural e comparativa da enzima ADA de *S. mansoni* e ADA humana. O software PyMOL é um programa de visualização molecular de código aberto, que possibilita a análise e animações de estruturas em 3D.

A análise comparativa da enzima ADA de *S. mansoni* (Figura 10 – vermelho) e a enzima ADA humana (3IAR) (Figura 10 – azul), é apresentada pela sobreposição das estruturas pelo software PyMOL.



**Figura 9.** Topologia da estrutura secundária de ADA, esquema obtido através do PDBsum. As setas na cor rosa representam as folhas-β, as setas azuis, as alças e os cilindros na cor vermelha representam as α-hélices. O N-terminal é representado pela letra N e o C-terminal pela letra C.

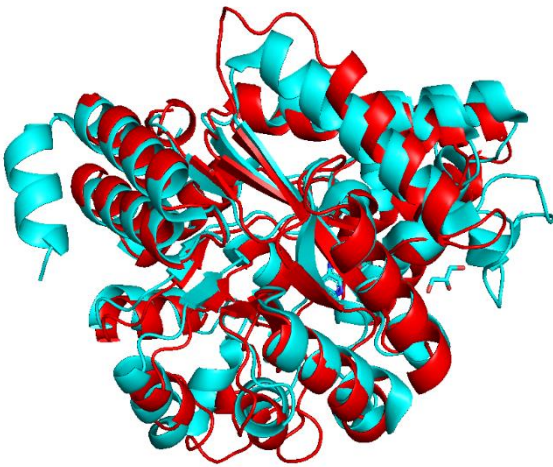


**Figura 10.** Estrutura de ADA de *S. mansoni* (modelo), em vermelho e ADA humana, em azul.

A sobreposição da estrutura modelada de ADA de *S. mansoni* e da estrutura de ADA humana, pelo software PyMOL, resultou em um valor de RMSD de 3.021Å. É possível observar na sobreposição das estruturas que ocorre uma sobreposição parcial das estruturas secundárias, tendo variações em várias regiões com diversas estruturas como *loop*, folha-β e α-hélices, como pode ser observado na Figura 11.

Apesar das estruturas apresentarem-se conservadas e apresentarem uma certa semelhança estrutural, com alfas hélices nas regiões mais externas e uma folha beta no interior na proteína, as mesmas não são completamente sobreponíveis. Algumas estruturas como *loop* e α-hélices de ambas as proteínas não apresentam qualquer

sobreposição, como esperado a partir dos valores de RMSD obtidos.



**Figura 11.** Sobreposição de estruturas tridimensionais de ADA de *S. mansoni* (modelo) representada pela cor vermelha e ADA humana (3IAR) representada pela cor azul.

Analisando a estrutura de ADA humana disposta no PDB, estabeleceu-se o sítio ativo com a seleção de aminoácidos presentes a 5Å do ligante, que corresponde aos resíduos: His-12, His-14, Asp-16, Phe-58, Tyr-99, His-211, Glu-214, Asp-292.

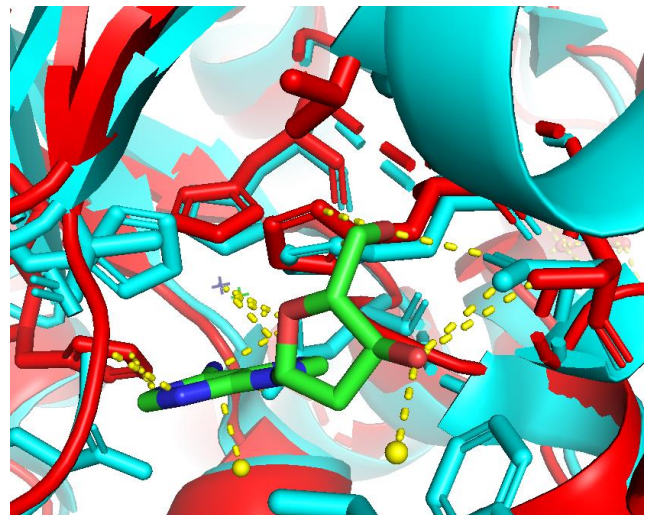
A partir da sobreposição dos sítios ativos da estrutura modelada de ADA de *S. mansoni* e ADA humana nota-se que os resíduos de aminoácidos que compõe cada região do sítio ativo são pouco conservados. Os resultados sugerem a conservação apenas de His-12, His-14 e a substituição dos demais resíduos. As substituições podem ser observadas na tabela 01.

**Tabela 1.** Substituições de aminoácidos.

ADA HUMANA	MODELO
Phe	Lys
Asp	Ser
His	Asp
Glu	Gly
Asp	Ser
Tyr	Thr

A Figura 12, apresenta a região do sítio ativo das duas estruturas sobrepostas. As

estruturas do modelo de ADA de *S. mansoni* são representadas na cor vermelha, as estruturas de ADA humana são representadas na cor azul, moléculas de água estão representadas como esferas na cor amarela. As ligações de hidrogênio são representadas pelas linhas pontilhadas amarela.



**Figura 12.** Sobreposição dos sítios ativos do modelo de ADA de *S. mansoni*, e ADA humana, representas em vermelho e azul, respectivamente.

Vale ressaltar que o molde utilizado para a obtenção do modelo de ADA de *S. mansoni* não possui ligante em sua estrutura disposta no PDB. Deste modo, as posições das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos no sítio ativo do modelo podem variar quando na presença de um ligante, devido a adaptação estrutural da proteína. Conforme NELSON; COX, 2020, a interação de uma proteína com seu ligante está associada a uma mudança na conformação da proteína que promove uma conformação complementar ao ligante.

Apesar disso, é possível inferir que as substituições de aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima do parasito em relação a humana devem ser exploradas através de docagem molecular e posteriormente experimentos laboratoriais para investigar e embasar estratégias da utilização de análogos de ligantes como possíveis inibidores enzimáticos. Essa incorporação diferencial entre análogos de adenosina foi observada em 1987 pelos pesquisadores El Kouni e Cha na enzima Adenosina Kinase (AK) de *S. mansoni*, e explicada experimentalmente através da



determinação da estrutura tridimensional da enzima por ROMANELLO, 2013.

Analisando a enzima AK e o posicionamento da adenosina no sítio ativo e as ligações de hidrogênio que esta faz, fica coerente a observação de EL Kouni & Cha, 1987 que testaram a incorporação de nove análogos de adenosina e demonstraram que o *S. mansoni* não é capaz de fosforilar os análogos: sangivamicina, 3'-deoxisangivamicina e 1-metiformicina em contraste com os outros testados. Fato esse que pode ser atribuído ao tamanho do grupo inserido na posição 7 no lugar do nitrogênio da base nitrogenada, por ser muito volumoso este grupo provavelmente se chocaria com o resíduo Thr136 que está ligado ao N7 da molécula de adenosina com distância de 2.82Å.

A partir das análises do modelo tridimensional de ADA de *S. mansoni* obtido, sugere-se que esta enzima seja considerada para experimentos complementares de investigação do seu potencial para o desenvolvimento de novos fármacos de forma integrada na via metabólica de salvação de purinas.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo buscou, através de técnicas de modelagem molecular, a predição da estrutura de ADA de *Schistosoma mansoni* uma vez que esta não foi resolvida experimentalmente. Através de métodos de validação do modelo obtido foi possível inferir que se obteve um modelo da proteína robusto e validado, atendendo os padrões requeridos e predizendo representações similares da estrutura da enzima. A análise comparativa do modelo de ADA de *Schistosoma mansoni* e ADA humana, através da sobreposição das duas enzimas, possibilitou identificar diferenças estruturais entre as duas proteínas, especialmente na região do sítio ativo indicando a substituição de 6 resíduos de aminoácidos que interagem diretamente com o ligante. Essas informações são importantes para embasar estudos bioquímicos de investigação da possibilidade de a enzima do parasito representar um alvo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos através de docagem, cinética enzimática e experimentos de cristalização e co-cristalização com ligantes e inibidores.

### AGRADECIMENTOS

Apoio Financeiro de Bolsa de Produtividade PQ Edital 02/2022 da Universidade do Estado de Minas Gerais.

### REFERÊNCIAS:

BRASIL. Vigilância esquistossomose mansoni – diretrizes e técnicas. 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

CAGNAZZO, T. D. O.; NOGUEIRA, C. T.; CASTRO, C. A.; NERIS, D. M.; FATTORI, A. C. M.; CORREIA, R. D. O.; ALBUQUERQUE, Y. R.; FRAGELLI, B. D. D. L.; MENDES, T. M. F.; ALLEGRETTI, S. M.; SOARES, E. G.; ROMANELLO, L.; TORINI, J. R.; PEREIRA, H. D. M.; ANIBAL, F. F. Investigating Immunization with Nucleotide Enzymes of *Schistosoma mansoni*: Nucleoside Diphosphate Kinase and Adenylosuccinate Lyase as New Antigenic Targets Against Schistosomiasis. *Frontiers in Immunology*, 2020.

CANDURI, F.; SILVEIRA, N. J. F.; CAMERA, J. C. J. R.; DE AZEVEDO, W. F. J. R. Structural bioinformatics study of cyclin-dependent kinases complexed with Inhibitors. *Eclética Quím.* 2003.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. Parasites – Schistosomiasis. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>

DA SILVA NETO, A. M.; TORINI DE SOUZA, J. R.; ROMANELLO, L.; CASSAGO, A.; SERRÃO, V. H. B.; DEMARCO, R.; BRANDÃO-NETO, J.; GARRATT, R. C.; PEREIRA, H.M. Analysis of two *Schistosoma mansoni* uridine phosphorylases isoforms suggest the emergence of a protein with a non-canonical function. *Biochimie (Paris. Print)*, 2016.

EL KOUNI, M. H., CHA, S.: Metabolism of adenosine analogues by *Schistosoma mansoni* and the effect of nucleoside transport inhibitors. *Biochem Pharmacol*, 1987.

FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel

and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 51, n. 1, p. 83-88, 1994.

FATTORI, A. C. M.; et al. Effects of Immunization with Recombinant *Schistosoma mansoni* Enzymes AK and HGPRT: Murine Infection Control. PATHOGENS **JCR**, v. 12, p. 69, 2023.

FERREIRA, L. F.; REINHARD, K. J.; ARAÚJO, A. Paleoparasitologia. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008.

HAGAN, P.; APPLETON, C. C.; COLES, G. C.; KUSEL, J. R.; TCHUEM-TCHUENTE, LA. Schistosomiasis control: keep taking the tablets. Trends Parasitol, 2004.

HICKMAN, C. P., et. al. Princípios integrados de Zoologia. 16. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. 2003.

KRICZINSKI, R.; ROMANELLO, L. Modelagem molecular comparativa da enzima Adenilsuccinato Sintetase (ADSS) do parasito *Schistosoma mansoni*. LUMINÁRIA, v. 22, p. 31-39, 2020.

KZIOZEK, L.; LORSCHIEDER, C. A.; ROMANELLO, L. Modelagem molecular comparativa da enzima Adenosina Kinase isoforma 1 (AK1) de *Schistosoma mansoni*. LUMINÁRIA, v. 23, p. 36-45, 2021.

LIMA, C. V.; MODA, D. B.; ROMANELLO, L. Modelagem molecular de isoformas e docagem molecular da enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT) de *Schistosoma mansoni*. LUMINÁRIA, v. 22, p. 35-49, 2020.

MARQUES, I. D. A.; ROMANELLO, L.; DEMARCO, R.; PEREIRA, H. D.M. Structural and kinetic studies of *Schistosoma mansoni* adenylate kinases. Molecular and Biochemical

Parasitology (Print), v. 185, p. 157-160, 2012.

NCBI. BLAST. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> Acesso em 01/09/2020.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2020.

NERIS, D. M ; PEREIRA, H.M ; CORREIA, R.O ; OLIVEIRA, S.R.P ; DEJANI, N.N ; RODOLPHO, J.M.DE.A ; SOUZA, L.C ; FATTORI, A. C. M. ; ROMANELLO, L. ; TORINI, J. R. ; RODRIGUES, V. ; ANIBAL, F. F. . Evaluation of immunization with purine salvation pathway recombinant enzymes in *Schistosoma mansoni* worms and eggs in murine schistosomiasis. INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH, v. 1, p. 894-905, 2013.

NERIS, D. M. ; PEREIRA, H. M. ; CORREIA, R. O. ; OLIVEIRA, S. R. P. ; DEJANI, N. N. ; RODOLPHO, J. M. A. ; SOUZA, L. C. ; FATTORI, A. C. M. ; ROMANELLO, L. ; SOUZA, J. R. T. ; RODRIGUES, V. ; ANIBAL, F. F. . Evaluation of immunization with purine salvation pathway recombinant enzymes in *Schistosoma mansoni* worms and eggs in murine schistosomiasis. International Journal of Advanced Research, v. 1, p. 894, 2014.

NERIS, D.M. ; PEREIRA, H. D'M.; SOUZA, L.C ; CORREIA, R.O ; RODOLPHO, J.M.A ; OLIVEIRA, S.R.P ; DEJANI, N.N ; ADACHI, F.P ; RODRIGUES, V ; GARRATT, RICHARD C. ; ANIBAL, F.F . Immunization with Purine Salvation Pathway Recombinant Enzymes Induces the Production Of Anti- *Schistosoma Mansoni* Immunoglobulines. International Trends in Immunity, v. 1, p. 49, 2013.

PARANÁ, Secretaria da saúde. Esquistossomose - Informações Gerais. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?>

PEREIRA, H. D.; FRANCO, G. R.; CLEASBY, A.; GARRATT, R. C. Structures for the potential

drug target purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni* causal agent of schistosomiasis. *Journal of Molecular Biology*, v. 353, n. 3, p. 584-599, Oct. 2005.

PEREIRA, H. M.; DEMARCO, R.; ROMANELLO, L.; de Souza, J. R. T.; Caldas, V. E. A.; SERRÃO, V. H. B.; CASSAGO, A.; GARRATT, R. C.. Studies of nucleotide metabolism from blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Acta Crystallographica. Section A, Foundations of Crystallography JCR*, v. 67, p. C288-C289, 2011.

PEREIRA, H. M.; REZENDE, M. M.; CASTILHO, M. S.; OLIVA, G.; GARRATT, R. C. Adenosine binding to low-molecular-weight purine nucleoside phosphorylase: the structural basis for recognition based on its complex with the enzyme from *Schistosoma mansoni*. *Acta Crystallographica D*, v. 66, n. Pt 1, p. 73-79, Jan. 2010.

PEREIRA, H.; FRANCO, G.; CLEASBY, A.; GARRATT, R. Structures for the Potential Drug Target Purine Nucleoside Phosphorylase from Causal Agent of Schistosomiasis. *Journal of Molecular Biology JCR*, Amsterdam, v. 353, p. 584-599, 2005.

PERREIRA, H. d`M. Enzima purina nucleosideo fosforilase de *Schistosoma Mansoni*: estruturas cristalográficas, estudos cinéticos e descoberta de novos ligantes. São Carlos – SP. 2003.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. *Parasitologia médica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977.

PRATA, A. R.; COURA, J. R.: Fases e formas clínicas da Esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, OS., COELHO, PMZ., and LENZI, HL. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinária. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. 2008, pp. 739-787.

ROMANELLO, L. Estudos das enzimas adenosina kinase e hipoxantina guanina fosforibosiltransferase de *Schistosoma mansoni*.

2011, 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

ROMANELLO, L.; BACHEGA, J. F. R.; CASSAGO, A.; BRANDAO-NETO, J.; GARRATT, R.; DE MARCO, R.; DEMUNIZ PEREIRA, HUMBERTO. Adenosine kinase from : structural basis for the differential incorporation of nucleoside analogues. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, v. 69, p. 126-136, 2013.

ROMANELLO, L. et al. Structural and kinetic analysis of *Schistosoma mansoni* Adenylosuccinate Lyase ( Sm ADSL). *Molecular and Biochemical Parasitology (Print)*, p. 27-35, 2017.

ROMANELLO, L. et al. In vitro and in vivo characterization of the multiple isoforms of *Schistosoma mansoni* Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases. *MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY*, v. 229, p. 24-34, 2019.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology*, v.234, p.779-815, 1993.

SCORTECCI, J. F. et al.. Spectroscopic and calorimetric assays reveal dependence on dCTP and two metals (Zn<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>) for enzymatic activity of *Schistosoma mansoni* deoxycytidylate (dCMP) deaminase. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-PROTEINS AND PROTEOMICS*, p. 1326-1335, 2017.

SERRÃO, V. H. B.; ROMANELLO, L.; CASSAGO, A.; TORINI DE SOUZA, J. R.; CHELESKI, J.; DEMARCO, R.; BRANDAO-NETO, J.; PEREIRA, H. M.. Structure and kinetics assays of recombinant *Schistosoma mansoni* dihydrofolate reductase. *ACTA TROPICA*, p. 190-196, 2017.

SOUZA, F. P. C. d.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. de P.; et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. 2011.

Recebido em: 10/08/2023.

Aceito em: 14/12/2023.

TORINI DE SOUZA, J. R. ; BRANDAO-NETO, J. ; DE MARCO, R. ; Pereira, H. M. . Crystal Structure of Schistosoma mansoni Adenosine Phosphorylase/5'-Methylthioadenosine Phosphorylase and Its Importance on Adenosine Salvage Pathway. PLoS Neglected Tropical Diseases (Online), v. 10, p. e0005178, 2016.

TORINI, J. R. et al.. Characterization of a Schistosoma mansoni NDPK expressed in sexual and digestive organs. MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, v. 231, p. 111187, 2019.

TORINI, J. R. et al. . The molecular structure of Schistosoma mansoni PNP isoform 2 provides insights into the nucleoside selectivity of PNPs. PLoS One, v. 13, p. e0203532, 2018.

VAN DER WERF, M. J.; DE VLAS, S. J.; BROOKER, S.; LOOMAN, C. W.; NAGELKERKE, N. J.; HABBEMA, J. D.; ENGELS, D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. Acta Tropica, v. 86, n. 2-3, p. 125-39, May. 2003.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER - Current Protocols in Bioinformatics. Protein Sci, 2016.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. What is schistosomiasis? The disease. 2019. Disponível em: <http://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/>.

ZERAIK, A. E. ; BALASCO SERRÃO, V. H. ; ROMANELLO, L.; TORINI, J. R.; CASSAGO, A.; DEMARCO, R.; PEREIRA, H. D.M. Schistosoma mansoni displays an adenine phosphoribosyltransferase preferentially expressed in mature female gonads and vitelaria. MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY **JCR**, v. 214, p. 82-86, 2017.