UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ANTÔNIO MARINHO DA SILVA NETO

Caracterização estrutural da Uridina Fosforilase de *Schistosoma mansoni*.

São Carlos

2013

ANTÔNIO MARINHO DA SILVA NETO

Caracterização estrutural da Uridina Fosforilase de *Schistosoma mansoni*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Marinho da Silva Neto, Antonio
Caracterização Estrutural da Uridina Fosforilase
de *Schistosoma mansoni* / Antonio Marinho da Silva
Neto; orientador Richard Charles Garratt - versão
corrigida -- São Carlos, 2013.
133 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Cristalografia. 2. *Schistoma mansoni*. 3.
Uridina Fosforilase. 4. Metabolismo de Nucleotídeos.
I. Garratt, Richard Charles, orient. II. Título.

Folha de Aprovação

Ao meu avô, Antônio Marinho da Silva (*in memoriam*),

AGRADECIMENTOS

A minha esposa, Katarina Holanda, por estar sempre ao meu lado na saúde e na doença, na CAPES e na FAPESP. Aos meus pais, Sandoval Oliveira e Edilene Cristina, pelo amor e apoio incondicional, além de me iludirem desde pequeno com frases como “estude meu filho, estude bem muito que você vai ficar rico”.

Ao prof. Dr. Richard Charles Garratt, uma das melhores pessoas que já tive o prazer de conhecer, por ter me dado a oportunidade de ser seu aluno e sempre que possível ter dedicado tempo contribuindo na minha formação profissional e pessoal. Além da paciência incomensurável, pela educação e classe que só um *lord* inglês tem na hora de dizer “você está errado”.

Ao Dr. Humberto D’Muniz pela oportunidade de poder trabalhar em um dos seus projetos e pelo companheirismo. A Msc. Juliana Torini pela paciência ao ensinar-me a lidar com os experimentos na bancada e por não ter conseguido me matar quando derrubei uma de suas caixinhas de cristalização. A Msc. Larissa Romanello por ter disponibilizado os resultados dos seus experimentos de biologia molecular apresentados nesta dissertação.

Aos “Gordão”, Fernando “el diablo” Bachega, Fernando Vasconcelos “tuf-tuf” Maluf, Gustavo “Udinho” Lima, e aos membros da “gangue do machado”, Marco “Kado” Kadowaki, Evandro “Pequena *Miss Sunshine*” Araújo e “Regivaldo” Kuroshu, pelo companheirismo e por sempre se disponibilizarem a ajudar em todas as etapas e dificuldades encontradas durante meu mestrado.

A todos os amigos do laboratório, em especial à Amanda “Piada” Câmara (peça fundamental da Espetacular Comissão Organizadora do Site – ECOS –), Daiane Evelin e Renatinha “Angry Bird” pela amizade. A todos os funcionários, alunos e professores que fazem o Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural.

“It is useless to have exact figures if they are exact figures about an inexact
phrase”

G. K. Chesterton

RESUMO

SILVA-NETO, A. M. **Caracterização estrutural da Uridina Fosforilase de *Schistosoma mansoni***. 2013. 133p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013

A esquistossomose humana, doença causada pelo *S. mansoni* e com 6 milhões de infectados somente no Brasil, possui uma única estratégia terapêutica eficiente atualmente disponível. Esta se baseia na utilização de praziquantel e relatos de cepas resistentes à essa droga tem despertado o interesse da comunidade científica sobre o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Uma melhor caracterização dos processos metabólicos do parasita podem auxiliar nestas buscas. Diante desse contexto, nosso grupo tem trabalhado na caracterização estrutural e funcional das enzimas que compõem a via de salvação de purinas e pirimidinas deste parasita, com dez enzimas já caracterizadas. Uma das enzimas remanescentes é a uridina fosforilase (UP) (EC 2.4.2.3), cujo a qual o genoma do parasita apresenta duas isoformas, a smUPa e smUPb (92% de identidade entre elas). Com o objetivo de caracterizar estruturalmente estas enzimas, ambas foram obtidas via expressão heteróloga, purificadas e submetidas a ensaios de cristalização e co-cristalização (para obtenção das estruturas interagindo com diferentes ligantes). Após coleta de dados de difração de raio-x, processamento e refinamento adequado foram obtidas seis estruturas da smUPa (smUPa_{apo}, smUPa+Timidina, smUPa+timina, smUPa+uracil, smUPa-5fluorouracil) e duas da smUPb (smUPb_{apo} e smUPb+citrato). A análise das estruturas revela que as duas isoformas apresentam essencialmente a mesma estrutura, no entanto, apesar das poucas divergências em nível de sequência de aminoácidos, existem diferenças significativas entre os sítios ativos. A smUPa apresenta o sítio com as mesmas características de UPs conhecidas, em contrapartida a smUPb apresenta duas mudanças significativas que elimina a capacidade de interagir com a base nitrogenada (Q201L) e a cavidade que acomoda a base nitrogenada (G126D), o que torna as smUPs um caso único de isoformas de UP em um mesmo organismo conhecidas. É plausível que a smUPb não seja capaz de catalisar a fosforólise reversível da uridina, sendo ou um pseudogene ou alguma outra enzima com atividade catalítica diferente da UP. Para a completa caracterização destas

enzimas, testes de atividade enzimática serão realizados e deverão auxiliar a determinar a real função da smUPb.

Palavras-chaves: Cristalografia. Uridina Fosforilase. *Schistosoma mansoni*.

ABSTRACT

SILVA-NETO, A. M. **Structural characterization of Uridine Phosphorylase from *Schistosoma mansoni***. 2013. 123p; Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013

Human schistosomiasis, a disease caused by *Schistosoma sp.*, is estimated to affect six million individuals in Brazil alone and there is currently only one therapeutic strategy available. This is based on the use of praziquantel and reports of the appearance of strains resistant to the drug has motivated the scientific community towards the search for new possible therapies. Biochemical characterization of the parasite's metabolism is essential for the rational development of new therapeutic alternatives. Based on this, reasoning our group has been working on the structural and functional characterization of the enzymes involved in the pyrimidine and purine salvage pathways of *S. mansoni*. One of the remaining enzymes to be characterized is uridine phosphorylase (UP) (EC 2.4.2.3), for which there are two isoforms present in the parasite genome, smUPa and smUPb, which share 92% sequence identity. In order to structurally characterize these enzymes, both smUPs were produced by heterologous expression, purified and submitted to crystallization e co-crystallization assays, in the latter case in order to obtain the structure of different enzyme-ligand complexes. After data collection, processing and refinement, five structures of smUPa (smUPa_{apo}, smUPa+Timidina, smUPa+timina, smUPa+uracil and smUPa+5fluorouracil) and two structures of smUPb (smUPb_{apo} and smUPb+citrato) were obtained. Analysis of the structures revealed that the isoforms have the same fold, but despite the high sequence identity, significant differences are observed at the active site probably profoundly affecting enzyme activity. Whilst SmUPa presents an active site similar to that of other known UPs, smUPb is predicted to lack the ability to interact with the nucleoside base due to the presence of a leucine in place of a glutamine at position 201 and an aspartatic acid in place of glycine at position 126. These differences turn the smUPs into a unique case of UP isoforms. It is plausible that smUPb is unable to catalyze the reversible phosphorolysis of uridine and could be either a pseudogene or a different enzyme altogether of unknown catalytic

activity. A complete functional characterization *in vitro* will be necessary in order to determine its real function.

Keywords: Crystallography. Uridine Phosphorylase. *Schistosoma mansoni*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Prevalência da esquistossomose no Brasil de 1977 à 2002. ⁴³	35
Figura 2 - Redução da morbimortalidade e hospitalização associada a esquistossomose no Brasil ⁴³	36
Figura 3 - Regiões do Brasil com focos de transmissão do <i>S. mansoni</i> ⁴⁴	36
Figura 4 - Fluxo migratório humano (setas) e distribuição de hospedeiros intermediários do <i>S. mansoni</i> no Brasil ⁴³	37
Figura 5 - Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>	39
Figura 6 - Ovos de <i>Schistosoma</i> sp.	40
Figura 7 - Casal de <i>Schistosoma mansoni</i> ²	41
Figura 8 - Ascite e nanismo causado por infecção por <i>S. japonicum</i> ²	44
Figura 9 - Via de salvação de pirimidinas em <i>S. mansoni</i>	47
Figura 10 - Reação de fosforólise reversível da uridina	49
Figura 11 - Características estruturais conservadas na super-família NP	55
Figura 12 - Mecanismo comum de ligação ao anel pirimídico de Uridina Fosforilases	57
Figura 13 - Alinhamento entre os aminoácidos dos genes <i>Smp_082420</i> e <i>Smp_082430</i> isoformas da <i>smUP</i> de <i>Schistosoma mansoni</i>	59
Figura 14 –Gel de poliacrilamida com as alíquotas da purificação da UPb e cristais da <i>smUP</i>	68
Figura 15 – Mapas de densidade eletrônica de regiões equivalentes dos dímeros da <i>smUPaapo</i>	76
Figura 16 - Representação do B-fator em função do backbone da <i>smUPaapo</i>	77
Figura 17 - Homodímero da <i>smUPa</i>	79
Figura 18 – Estrutura secundária do monômero	80

Figura 19 – Duas moléculas de Timidina e Sulfato no homodímero da smUPa+timidina.	81
Figura 20 – Ligações de hidrogênio entre a base nitrogenada da timidina e o sítio ativo	83
Figura 21 – Rede de ligação de hidrogênio envolvendo Q201, R259 e uma molécula de água	83
Figura 22 – Ligações de hidrogênio entre a ribose da timidina e o sítio ativo da smUPa+timidina	84
Figura 23 – Resíduos do sítio ativo da smUPa+timidina que fazem contatos de Van der Waals com o nucleosídeo.....	84
Figura 24 - Ligações de hidrogênio entre o fosfato e resíduos do sítio ativo da smUPa+timidina	86
Figura 25 – Conformações dupla do R50 da cadeia A da smUPa+timidina.....	86
Figura 26 – Divisão do L17 da smUPa+timidina.	87
Figura 27 – Ligações de hidrogênio entre a região A do L17 com o L8 e moléculas de água.....	88
Figura 28 – Ligações de hidrogênio entre os resíduos da região B do L17 e a K216, N358 e H2O	89
Figura 29 - Interação entre os resíduos R259 e D263 do L17 da smUPa+timidina com resíduos (Q201 e R203) e uma molécula de água envolvidos na ligação a timidina.....	90
Figura 30 – Ligação de hidrogênio entre o Q264 da região C do L17 da smUPa+timidina com o D205, D18, V19 e duas moléculas de água.	90
Figura 31 – Ligações de hidrogênio entre os resíduos da região C do L17 da smUPa+timidina com moléculas de água.....	91
Figura 32 – Sobreposição do dímero AB das estruturas da smUPaapo e smUPa+timidina.	92
Figura 33 – Sobreposição dos resíduos que compõem o sítio ativo da smUPaapo e smUPa+timidina.....	93
Figura 34 – Sobreposição dos resíduos que compõem o sítio de ligação ao fosfato da smUPaapo e smUPa+timidina.	93
Figura 35 – Sobreposição dos resíduos que compõem o loop L17 da smUPaapo e smUPa+timidina.....	94
Figura 36 – Sobreposição das estruturas da smUPa-timidina com asmUPa+5-fluorouracil, smUPa+timina e smUPa+uracil e região inicial do L4.....	96

Figura 37 – Interação entre os resíduos do sítio ativo da smUPa e 5-fluorouracil.	97
Figura 38 - Interação entre os resíduos do sítio ativo da smUPa e uracil.	98
Figura 39 - Interação entre os resíduos do sítio ativo da smUPa e timina.	99
Figura 40 – Sítio de ligação ao fosfato da estrutura da smUPa+5-fluorouracil.	100
Figura 41 – Sobreposição da smUPbapo e smUPaapo. Região do L12 e L17 estão ausentes na estrutura da smUPbapo.	103
Figura 42 - Distribuição espacial das divergências de aminoácidos entre a smUPa e smUPb.	103
Figura 43 – Mapa de densidade eletrônica da região do L17 da smUPbapo e da smUPaapo.	104
Figura 44 – Conformação ausente do L12 da smUPbapo, provável consequência da troca de aminoácidos R278L entre as isoformas	105
Figura 45 – Sobreposição dos resíduos que compõem o sítio ativo da smUPbapo e smUPaap.	106
Figura 46 – Impacto de Q201L e G126D no sítio ativo da smUPb em relação a smUPa.	106
Figura 47 – Superfície dos resíduos do sítio de ligação ao nucleosídeo da smUPb e smUPa.	107
Figura 48 – Sítio ativo da smUPb ocupada por uma molécula de citrato	109
Figura 49 – Sobreposição da região do sítio de ligação B, não ocupado pelo citrato, e A, ocupado pelo citrato do dímero AB da smUPb-citrato.....	109
Figura 50 – Mapa de densidade eletrônica do L17 do sítio ocupado pelo citrato (A) e sítio não ocupado (B) da smUPb-citrato.	110
Figura 51 – Alinhamento estrutural entre os aminoácidos que compõem o sítio da smUPa e hUP1.	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estatísticas da coleta e processamento dos conjuntos de dados das estruturas da smUPa.	70
Tabela 2 - Estatísticas da coleta e processamento dos conjuntos de dados das estruturas da smUPb.	71
Tabela 3 – Estimativa do conteúdo da unidade assimétrica das estruturas obtidas da smUPa.	72
Tabela 4 – Estimativa do conteúdo da unidade assimétrica das estruturas obtidas da smUPb.	72
Tabela 5 - Validação dos modelos obtidos por difração de raio-X da smUPa.	73
Tabela 6 - Validação dos modelos obtidos por difração de raio-X da smUPb.	73
Tabela 7 – Número de moléculas de água e resíduos modelados e loops não modelados da smUPa.	74
Tabela 8 – Número de moléculas de água e resíduos modelados e loops não modelados da smUPb.	74
Tabela 9 - Estimativa da estabilidade em solução dos modelos cristalográficos realizada via PISA..	74
Tabela 10 - Regiões de interface entre as cadeias da unidade assimétrica dos modelos cristalográficos....	75
Tabela 11 - TM-score e RMSD calculado pelo Tmalign entre a smUPa e UPs de outros organismos.	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASA	Área de superfície acessível
ATP	Adenosina trifosfato
BAU	5-benzilaciclouridina
BBBAU	5-(benziloibenziloibenzil) aciclouridina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Área de superfície entrerrada
CCD	Dispositivo de carga acoplada
CTP	Citosina trifosfato
CytDA	Citidina desaminase;
DLS	Diamond Light Source
DTH	Reação de hipersensibilidade retardatória
EC	Enzyme Commision
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GTP	Guanosina trifosfato
HNF-4 α	Fator nuclear hepático 4 α
hUP	Uridina fosforilase humana
IFSC	Intituto de Física de São Carlos
IPTG	Isopropil β -D-1-thiogalactopiranosidio
LB	Luria-Bertani
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Sincrotron
mUP	Uridina fosforilase de camundongo
NCBI	Narional Center for Biotechnology Information
NDPK	Nucleosídeo difosfato quinase
NF	Neurofilamento
NMPK	Nucleosídeo monofosfato quinase
NP	Nucleosídeo fosforilase
PCE	Programa de Controle da Esquistosomose
PDB	Protein Databank
PECE	Programa Especial de Controle da Esquistossomose
PEG	Polietilenoglicol
PNP	Purina nucleosídeo fosforilase
PRPP	5-fosforibosil-1-pirofosfato
RMSD	Root-mean-square deviation
stUP	Uridina fosforilase de Salmonella typhimurium
TLS	Translational/Libration/Screw
UA	Unidade assimétrica
UCK	Uridina citidina quinase;
UK	Uracil fosforibosiltransferase;
UMP	Uridina monofosfato
UP	Uridina fosforilase

UTP
VDW

Uridina trifosfato
Contatos de Van der Waals

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	SCHISTOSOMA E ESQUISTOSSOMOSE	28
1.1.1	<i>Esquistossomose no mundo: do início da história escrita ao século XXI</i>	<i>28</i>
1.1.2	<i>Um breve histórico e uma introdução ao panorama atual da esquistossomose no Brasil</i>	<i>33</i>
1.1.3	<i>Biologia e ciclo de vida do Schistosoma mansoni.....</i>	<i>38</i>
1.1.4	<i>Patogênese, diagnóstico e tratamento da Esquistossomose</i>	<i>42</i>
1.1.5	<i>Metabolismo de Nucleotídeos no Schistosoma mansoni</i>	<i>45</i>
1.2	URIDINA FOSFORILASE.....	48
1.2.1	<i>Uridina Fosforilase: contexto metabólico e importância médica.</i>	<i>48</i>
1.2.1.1	Importância da UP para o efeito protetor contra isquemia, metabolismo de lipídios e acetilação de proteínas	50
1.2.2	<i>Uridina Fosforilase: Estrutura e função</i>	<i>53</i>
1.2.2.1	Super-família Nucleosídeo Fosforilases	53
1.2.2.2	Aspectos estruturais da UP	55
1.2.3	<i>S. mansoni e UP.....</i>	<i>57</i>
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1	AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM	61
2.2	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO	62
2.3	CRISTALIZAÇÃO	63
2.4	COLETA E PROCESSAMENTO	64

2.5	SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR, REFINAMENTO, VALIDAÇÃO E ANÁLISE DAS ESTRUTURAS.....	65
3	Resultados e Discussão.....	67
3.1	EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO, CRISTALIZAÇÃO E COLETA DE DADOS	67
3.2	OBTENÇÃO DOS MODELOS CRISTALOGRAFICOS	68
3.2.1	<i>Processamento dos dados de difração de raios-X, refinamento e validação dos modelos cristalográficos.</i>	68
3.2.2	<i>Mapa difuso no dímero CD o da smUPaapo.....</i>	75
3.3	SMUPA	78
3.3.1	<i>Sítio Ativo da smUPa-Timidina</i>	81
3.3.2	<i>Sítio de ligação ao nucleosídeo.....</i>	81
3.3.3	<i>Sítio de ligação ao fosfato</i>	85
3.3.4	<i>Loop 17</i>	87
3.4	SMUP1APO.....	91
3.5	SMUP1 URACIL, TIMINA E 5FU	94
3.6	SMUP2	101
3.7	SMUP2APO.....	101
3.8	SMUP2 CITRATO	108
3.9	COMPARAÇÃO DAS SMUPS COM UPS HUMANAS E DE OUTROS ORGANISMOS	111
3.10	IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS DAS ESTRUTURAS DAS SMUPS	113
4	Conclusão.....	119
	REFERÊNCIAS	121

1 INTRODUÇÃO

O *S. mansoni*, parasita responsável pela esquistossomose humana, pertence à família Schistosomatídeos. Os parasitas dessa família destacam-se pela alta produção de ovos, o que os tornam sistemas biológicos fascinantes no que diz respeito à demanda por nucleotídeos. Estimativas na literatura afirmam que um casal maduro de *S. mansoni* pode ser capaz de produzir de 300 a 1000 ovos por dia¹. Além disso, a alta produção de ovos diretamente relacionada à patogenicidade da esquistossomose e a relevância global da esquistossomose na saúde pública e economia² torna o *S. mansoni* um organismo de elevado interesse acadêmico. Dentro desse contexto, a caracterização funcional e estrutural das enzimas envolvidas na síntese de nucleotídeos do *S. mansoni* são essenciais para identificação de possíveis novos alvos terapêuticos e na compreensão geral sobre metabolismo de nucleotídeos.

Existem duas alternativas metabólicas para a produção de nucleotídeos, sejam purinas ou pirimidinas, a via *de novo* e a via de salvação (reutilização das moléculas já sintetizadas). O *S. mansoni* é incapaz de realizar a produção de purinas pela via *de novo*, de modo que este organismo depende única e exclusivamente da via de salvação para obter adenina e guanina³. Por outro lado, a via *de novo* e de salvação para produção de pirimidinas estão disponíveis para o *S. mansoni*⁴⁻⁶. Considerando a importância dessas vias e a falta de estudos sobre o tema, nosso grupo tem como objetivo principal caracterizar e explorar a relação entre estrutura e função de todas as enzimas de ambas as vias.

Nos últimos anos, nosso grupo caracterizou estruturalmente 10 estruturas das vias de purinas e pirimidinas. A caracterização estrutural e funcional das demais enzimas está em andamento e uma dessas é a Uridina Fosforilase (UP) (EC 2.4.2.3), importante componente da via de salvação de pirimidinas. A UP catalisa a fosforólise reversível da uridina com a formação de uracil e ribose-1-fosfato e possui um papel muito importante no contexto metabólico, pois os produtos desta reação são importantes para diversas vias. Em face do papel essencial desta enzima, este trabalho visou caracterizar funcional e estruturalmente a UP de *S.*

mansoni a fim de auxiliar a compreensão do papel desta enzima no seu contexto biológico natural.

1.1 SCHISTOSOMA E ESQUISTOSSOMOSE

A relação entre esquistossomose e sociedades humanas remontam ao início da história registrada ^{7,8}, no entanto, ainda hoje 207 milhões de pessoas no mundo estão infectadas, segundo a Organização Mundial de Saúde ⁹. Dada sua inegável importância atual, somada a necessidade de apresentar o contexto no qual este trabalho se insere, se faz necessário apresentar o histórico do impacto dessa doença na humanidade e aspectos essenciais do parasita e da doença que este causa.

1.1.1 Esquistossomose no mundo: do início da história escrita ao século XXI

Uma observação de que o Egito é a terra onde homens menstruam foi atribuída a Herodotus na antiguidade, e este é um sintoma característico da infecção pelo *S. haematobium*, atualmente conhecida como haematuria⁸. Ovos calcificados de Schistossomas encontrados em duas múmias egípcias (1250-1000 AC) (Ruffer, 1910) e em uma múmia chinesa (~ 2100 AC)¹⁰, antígenos de schistosoma detectados em uma múmia de ~5000 AC¹¹ e uma prevalência de 65% entre as múmias (350-550 DC) da área de Wadi Halfa na fronteira entre o Egito e Sudão¹² são evidências que indicam a presença da esquistossomose no Egito e China desde a antiguidade.

É possível ainda que a esquistossomose fosse tão comum na Mesopotâmia e na Palestina como era no Egito, pois há evidências da presença da *Bulinus*

truncatus, hospedeiro intermediário do *S. haematobium*, em tijolos datados de 4000 AC^{13,14} e em estratos geológicos da era do bronze (~1650 AC)¹⁵ em Jericó. Um relato bíblico aponta que séculos após a destruição da cidade de Jericó, com o fim da população humana naquela área e, conseqüentemente, de todos acometidos pela doença, Elias removeu a “maldição da cidade” usando sal nas águas, alguns séculos antes da cidade ser reconstruída o que poderia ter eliminado o hospedeiro intermediário do Schistosoma. “Então saiu ele [Elias] ao manancial das águas e deitou sal nele; e disse: Assim diz o SENHOR: Tornei saudáveis estas águas; já não procederá daí morte nem esterilidade”, 2º Reis 2:21. Difícil dizer se esta teria sido a primeira medida da história contra a prevalência da esquistossomose, mas estes dados tornam plausível a hipótese que a doença não estivesse confinada apenas no Egito e China e acometesse um número significativo de pessoas na antiguidade. Independente disto, a doença se espalhou e continuou prevalente até os tempos modernos.

No século XIX, Fujii fez reconhecidamente o primeiro relato da esquistossomose, que afligia severamente o povo de Katayama, Japão. O relato de dores abdominais e os típicos estágios de desenvolvimento do que hoje é conhecido como hepatoesplenomegalia eram comuns entre os pacientes e faziam parte da “Síndrome de Katayama”. Trinta anos depois de sua descrição, Fujii escreveu: “Estou escrevendo novamente para pedir assistência de todos os acadêmicos para a solução deste problema”. O pedido de Fujii motivou a formação de um comitê científico em Katayama para tratar do assunto, no ano de 1882. O trabalho dos cientistas desse comitê resultou na eliminação de várias hipóteses sobre o envolvimento de outras parasitoses já conhecidas¹⁶, mas nada que pudesse embasar uma estratégia para o controle da doença.

Apesar do início da abertura econômica do Japão no século XIX e início do século XX, aliado ao fato dos relatos de Fujii terem sido publicados em japonês, seus trabalhos estavam praticamente inacessíveis ao ocidente naquela época, e só vieram a ser amplamente conhecidos quando Sasa, em 1972, fez uma revisão em inglês sobre o tema¹⁶. Paralelamente aos trabalhos japoneses, em uma série de cartas, Theodore Bilharz, médico alemão, chefe do departamento médico e professor de clínica médica no Hospital Kasr el Aini, comunicou os seus achados

em materiais de autópsia para von Siebold, que as publicou em nome de Bilharz. Nestas cartas, Bilharz descreve vermes presentes na parede da bexiga e nos vasos mesentéricos encontrados em uma série de autópsias, entre 1851 e 1853. Ao examinar os ovos com espinhas terminais encontrados na parede da bexiga e na urina ele relacionou corretamente com hematúria. No entanto, os ovos com espinha lateral encontrados na parede e no conteúdo intestinal, ele acreditava ser alguma espécie de capsula para uma possível forma que o organismo assumiria depois de sair dos ovos. Por cinquenta anos acreditou-se que uma única espécie de schistosoma era responsável pela forma intestinal e urinária e que a forma do ovo dependeria apenas do sítio anatômico no hospedeiro definitivo. Por suas descobertas o termo “Bilharzia” virou sinônimo da doença e, apesar de ter nomeado como *Distomon haematobium* e o gênero Bilharz ter sido criado, parasita ficou conhecido como Bilharzia mas o nome que permaneceria seria *Schistosoma haematobium*. Bilharz conseguiu identificar a causa da doença, mas falhou em não ter conseguido diferenciar as duas espécies. A questão das espécies e do ciclo de vida do parasita permaneceria como desconhecida até o início do século XX.

Em 1902, Manson expressou um pensamento que se tornava comum na comunidade científica: “Possivelmente existem duas espécies de Bilharzia, uma apresenta os ovos com espinha lateral, e deposita-os somente no reto, e outra deposita-os na bexiga ou no reto indiferentemente” (citado por Leiper, em 1918¹⁷). As duas espécies mais importantes foram descobertas na primeira década do século XX, *S. japonicum*, em 1904¹⁸, e o *S. mansoni*, em 1907¹⁹. Restava determinar o ciclo de vida do parasita. Sabia-se que esse parasita era capaz de infectar outros animais, isso permitiu o planejamento e realização de vários experimentos que vieram a solucionar este problema. Fujinami e Nakamura, em 1909, conduziram experimentos em um rio naturalmente infectado e confirmaram a rota de infecção pela pele ao demonstrar que invólucros de proteção nas pernas do gado preveniam a infecção¹⁸. Em 1912, Miyagawa concluiu que a forma invasiva era produto de uma alteração do miracídios em um hospedeiro intermediário desconhecido¹⁸. A medida que o conhecimento sobre o ciclo de vida do parasita foi avançando, medidas contra o hospedeiro intermediário foram o primeiro passo para controlar a doença, como por exemplo o uso de cal como

fertilizantes em plantações de arroz²⁰. Em 1915, Leiper foi ao Japão, onde conheceu Fujinami, e demonstrou a existência de uma “notável atração” entre que uma espécie em particular de moluscos, hoje conhecida como *Onchomelania nosophora*²¹. Vários aspectos da sociedade foram impactadas na I Guerra Mundial, os estudos sobre o ciclo de vida do *Schistosoma* não foi uma exceção. Os principais cientistas trabalhando nas áreas endêmicas da época eram originários de outros países e acabaram retornando a suas respectivas nações de origem. Leiper teve que retornar ao Reino Unido logo no início da guerra, Atkinson voltou a trabalhar para a Marinha e Looss teve que deixar seu laboratório no Egito para voltar para a Alemanha. No entanto, Leiper foi enviado pelo *War Office* ao Egito para “investigar a Bilharzia...para aconselhar medidas preventivas...para as tropas”²² e isso permitiu que os avanços continuassem. Os achados no Japão reforçaram a hipótese de que um molusco também seria necessário para o(s) schistosoma(s) africanos. Leiper, trabalhando no laboratório deixado por Looss, onde já haviam trabalhado juntos, provou que um hospedeiro intermediário era essencial para o ciclo de vida do *Schistosoma* africano, a infecção ocorria principalmente pela pele e a existência de duas espécies do parasita no Egito^{17,23}. Dessa forma, aos 35 anos, Leiper fez uma grande contribuição para solucionar um dos maiores problemas das doenças tropicais do século XX. A partir de então se tinha um quadro geral do parasita e seu ciclo, estava construída a base necessária para desenvolver pesquisas e medidas para controlar a doença e encontrar a melhor estratégia terapêutica estavam em andamento.

Em 1889, Manson afirmava que “existe um ponto fraco e desprotegido no ciclo de vida de todos os parasitas...o homem pode colocar seu dedo e cessar a transmissão da doença”²⁴. Se Manson estivesse correto, os dias da Bilharzia estariam chegando ao fim. Esse era o sentimento da comunidade científica naquela época. Leiper e Christopherson sugeriram dois pontos de ataques possíveis. Leiper era um entusiasta da alternativa de eliminar o hospedeiro intermediário, pois poderia erradicar a doença sem precisar intervir diretamente no comportamento humano²³. Christopherson considerava a eliminação praticável apenas em determinados locais e o tratamento em massa em escolas e vilas seria a melhor estratégia para erradicar a doença²⁵. Apesar de discordarem sobre a melhor estratégia, ambos acreditavam que seria fácil controlar ou mesmo erradicar

a doença. O tempo mostraria que ao controle da doença poderia se atribuir vários adjetivos, menos “fácil”.

Várias drogas foram desenvolvidas nas décadas seguintes, mas o desenvolvimento do praziquantel na década de 70^{26,27} substituiu todas as drogas na época desenvolvidas e se tornou, até hoje, a única droga de escolha²⁸. A principal vantagem do praziquantel é sua alta eficácia, o seu baixo custo (menos de US\$ 0,10 dólares por unidade) e tornar possível o tratamento quimioterápico em massa²⁸. Os programas de controle na África subsaariana baseados no uso desta droga tem levado a grandes reduções na esquistossomose^{29,30} e atualmente é a principal arma contra a doença em todo o globo. Apesar do baixo valor, o custo de tratar 128 milhões de crianças todos os anos e toda a logística envolvida em uma operação como esta não deve ser negligenciado. Mesmo com o desenvolvimento de drogas e moluscicidas eficientes, baratos e de fácil administração o controle da doença ainda é um problema.

Os trabalhos do início do século XX foram essenciais para o desenvolvimento de programas de controle da doença em vários países. Ainda hoje os trabalhos, conclusões e ideias desses cientistas ressoam na maneira como lidar com esta e outras doenças parasitárias. Atualmente, colocando em uma perspectiva global, a esquistossomose ainda é considerada a doença mais importante dentre as que envolvem transmissão por contato com água³¹. Apesar dos avanços, há estimativas que indicam que ainda há 779 milhões de pessoas em risco e 207 milhões de pessoas estão infectadas³¹ em todo o planeta. A África subsaariana ainda possui a maior parte da população infectada e em risco de infecção (660 milhões de pessoas das 779 no mundo todo) e os índices de mortalidade associados à doença permanecem alarmantes³¹. Por outro lado, as estratégias de controle tem sido bastante eficientes. Um dos mais bem sucedidos programas de controle da esquistossomose foi o japonês³² e com advento de moluscicidas modernos e tratamentos eficazes permitiu que a doença fosse erradicada em Katayama por volta de 1955¹⁶, décadas antes que a transmissão da doença fosse erradicada no Japão. Além do Japão, a esquistossomose foi eliminada também na Tunísia e está perto da eliminação no Marrocos e em algumas ilhas no Caribe^{7,18,33,34} e um significativo progresso tem sido feito no Brasil, China e

Egito^{35,36}. O maior empecilho para a eliminação da doença, principalmente na África, ainda parece ser produto da relação entre recursos e vontade política para investir em programas de tratamento em massa (baseado na administração do praziquantel) e saneamento básico para a população em risco.

Além do problema crônico no continente africano, a esquistossomose tem se espalhado para áreas anteriormente não endêmicas e projetos de suprimentos de água como grandes barragens e sistemas de irrigação^{31,37–39}, o aquecimento global⁴⁰ e o surgimento de focos de *S. mansoni* resistentes a única droga de escolha⁴¹ fazem parte do quadro de desafios ligados a esquistossomose no século XXI.

1.1.2 Um breve histórico e uma introdução ao panorama atual da esquistossomose no Brasil

O *S. mansoni* é a única espécie do gênero *Schistosoma* descrita no Brasil, provavelmente em virtude da inexistência de moluscos suscetíveis aos demais helmintos. Discute-se que o agente foi introduzido no Brasil pelo tráfico de escravos africanos e aqui encontrou seus hospedeiros – vertebrados (*H. sapiens sapiens*) e invertebrados (moluscos do gênero *Biomphalaria*) – e o ambiente propício para o seu desenvolvimento⁴². Apesar dos séculos de escravidão, o primeiro caso reconhecido da doença no Brasil foi descrito por Pirajá da Silva em 1908, mas somente em 1916 com os trabalhos de Adolpho Lutz sobre a cercária do *S. mansoni*, seu hospedeiro intermediário, biologia parasitária e métodos de diagnóstico que o interesse pela doença foi retomado. Em uma missão do Instituto Oswaldo Cruz em 1918, Lutz e Penna elaboraram um relatório sobre a epidemiologia da doença na região nordeste. Cerca de 30 anos depois, o primeiro programa de pesquisa coprológica, conduzido por Pellon e Teixeira, gerou o primeiro quadro da distribuição geográfica da esquistossomose no Brasil. Em 1965, Rodrigues da Silva, diretor do Instituto Nacional de Endemias Rurais estabeleceu o Plano Piloto e estabeleceu o primeiro programa de controle da

esquistossomose. Este programa visava avaliar a eficácia e o custo benefício de intervenções nas condições sanitárias, suprimento de água potável, educação sanitária, uso de moluscidas e tratamentos em massa isolados e em associação em áreas experimentais nos estados de Pernambuco, Bahia, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Esse programa foi planejado para ser realizado em 5 anos, mas com a morte do Dr. Rodrigues da Silva, o programa foi interrompido em 1968. Apesar disso, importantes informações sobre a evolução da doença, condições de saneamento básico, eficácia do uso de moluscidas e de tratamento em massa, foram obtidas ⁴³.

O segundo programa, o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE) só veio a ser estabelecido em 1976, em oito estados do nordeste, e objetivava reduzir a prevalência do *S. mansoni* para 4%. Em sua primeira fase, o PECE identificou 42.178 locais onde o molusco estava presente e, baseado em 739.995 exames coproscópicos, sugeriu uma prevalência de 22.8%. A estratégia de ação deste programa baseava-se em determinar a melhor abordagem de acordo com a prevalência da doença. O programa teve um certo sucesso, mas a dinâmica própria de cada foco fazia com que a decisão baseado apenas na prevalência nem sempre fosse eficaz. Muitas avaliações do impacto foram realizadas e, dependendo do local de análise, diferentes taxas de sucesso foram registradas. Almeida Machado, criador do PECE e um grande entusiasta, em 1982, publicou uma análise que enfatizava os aspectos positivos de seu programa, obviamente. A década seguinte, 1980-89, pode ser dividida em duas fases, a primeira (1980-84) com a diminuição da força do programa, basicamente pela descentralização das decisões e das restrições quanto a aplicação da quimioterapia em massa⁴³. A segunda fase (1985-89), houve uma tentativa de reestruturar o programa dividindo as áreas em 1) endêmico primária (alta prevalência e um longo histórico de transmissão), 2) endêmico secundário (transmissão recente devido a atividade profissional), 3) focos isolados (transmissão localizada) e 4) áreas vulneráveis (que apresentam risco de transmissão). Silveira, em 1989, resumiu os objetivos do programa em 1) supressão das formas severas via tratamento precoce, 2) redução da prevalência, 3) interrupção da transmissão em focos isolados e 4) evitar que as áreas vulneráveis se tornassem locais de transmissão. A partir de 1990, a Fundação

Nacional de Saúde (FUNASA), assumiu a direção do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE). Uma revisão dos dados de 1977-2002, publicada em 2004, sobre o impacto de todos esses programas mostra uma redução dramática da prevalência no final da década de 70, provavelmente resultado das atividades do PECE, e desde então esses valores variaram irregularmente (**Figura 1**)⁴³. A contribuição mais evidente do PCE é a redução da morbimortalidade da esquistossomose (**Figura 2**).

Apesar dos avanços, ainda existem regiões no Brasil que são focos de transmissão e a prevalência da doença é preocupante, com destaque para os estados Bahia e Minas Gerais ⁴⁴. Os fluxos de migração entre os estados de um país continental e dinâmico como o Brasil, associado a presença de hospedeiros intermediários viáveis para manutenção do ciclo de vida do *S. mansoni* em todo o Brasil (**Figura 3**), faz com que a esquistossomose se torne um problema nacional, especialmente para uma região com a importância social e economicamente para o país como a região sudeste (**Figura 4**).

Figura 1 - Prevalência da esquistossomose no Brasil de 1977 à 2002.⁴³

Figura 2 - Redução da morbimortalidade e diminuição da hospitalização associada a esquistossomose no Brasil⁴³.

Figura 3 - Regiões do Brasil com focos de transmissão do *S. mansoni* classificadas por prevalência⁴⁴.

Figura 4 - Fluxo migratório humano (setas) e distribuição de hospedeiros intermediários do *S. mansoni* no Brasil⁴³.

1.1.3 Biologia e ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

Um parasita multicelular como o *S. mansoni* apresenta estruturas morfológicas que permitem que estes desenvolvam determinados comportamentos essenciais de seu ciclo de vida. Uma vez que a doença é produto de uma fase do ciclo de vida parasitário, segue um breve panorama das principais características morfológicas e do ciclo de vida do *S. mansoni*.

O ciclo de vida do parasita (**Figura 5**) apresenta várias fases o que torna-o relativamente complexo. Vamos tomar como início do ciclo de vida deste parasita o momento após a postura de ovos no hospedeiro definitivo. Os ovos são depositados pelas fêmeas em veias do intestino grosso e possuem morfologia característica para cada espécie (**Figura 6**). Sua identificação nas fezes é utilizada no diagnóstico laboratorial da doença. Os ovos precisam atravessar a parede de vênulas e os tecidos intermediários até atingir a luz do intestino onde podem ganhar acesso as fezes e serem liberados no ambiente. O mecanismo dessa travessia ainda é desconhecido, sendo motivo de muita especulação^{45,46}. A presença destes ovos nos tecidos estimula a formação de granulomas, um fato importante pois a patogênese da esquistossomose é causada quase que inteiramente pelos ovos e não pelo verme adulto.

Uma vez próximo ao lúmen do intestino, as células do granuloma se dispersam e os ovos já completamente embrionados são excretados pelas fezes. Ao entrar em contato com a baixa osmolaridade da água os ovos eclodem por mecanismos também pouco conhecidos. Normalmente, o primeiro indício da eclosão é a ativação dos cílios do miracídio até este se mover vigorosamente dentro do ovo até que se parte. A partir deste momento o miracídio pode nadar livremente e este pode sobreviver por até uma ou duas horas. Aparentemente, os miracídios possuem fotorreceptores e são fototrópicos⁴⁷. Por alguma razão ainda desconhecida, a proximidade com o hospedeiro intermediário faz com que o miracídio nade mais rapidamente e mude de direção com mais frequência, aumentando a probabilidade de encontrar o caramujo.

Figura 5 - Ciclo de vida do *S. mansoni*. Ovos são eliminados nas fezes ou urina, em condições ideais há eclosão dos ovos e liberação de miracídeos, que nadam e penetram em hospedeiro intermediário específico (moluscos). Os estágios no caramujo incluem duas gerações de esporocistos e a produção de cercárias. Após liberadas do caramujo, as cercárias infectantes nadam e penetram na pele do hospedeiro humano, perdendo sua cauda, passando a ser esquistossômulo. Os esquistossômulos disseminam-se pelo sangue e atingem o fígado onde se maturam na forma adulta. Adultos emparelham-se e migram para o plexo venoso do intestino (*S. mansoni* e *S. japonicum*) ou plexo venoso da bexiga (*S. haematobium*). Os ovos são eliminados com as fezes ou urina, respectivamente. Fonte: (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>).

Figura 6 - Ovos de *Schistosoma* sp. Ovos de (A) *S. mansoni*, (B) *S. haematobium* e (C) *S. japonicum* e (D) ovos de *S. mansoni* em um granuloma da parede intestinal.

Após a penetração no caramujo, o miracídio ocupa o epitélio e inicia seu desenvolvimento em uma produtora de esporocistos. Uma vez maduro o esporocisto “mãe” continua gerando esporocistos “filhas”, esses normalmente migram para outros órgãos do caramujo. Cerca de quatro semanas depois da penetração inicial, as cercarias emergem dos esporocistos “filhas” e estas nadam até a superfície e afundam lentamente, mantendo esse comportamento por até três dias. Secreções da pele atraem as cercarias e ao ocorrer contato com um hospedeiro suscetível, como um humano, ela pode se fixar e lentamente “escorregar” como se procurasse um local suscetível a penetração. Um fato

interessante é que as cercarias apresentam uma atração positiva muito forte ao aminoácido arginina e, quando estimuladas, começam a produzir mais arginina atraindo mais cercarias para o local².

A penetração ocorre através de movimentos vigorosos, secreção de várias substâncias e é acompanhada da perda da calda da cercaria. Com aproximadamente 24 horas, os pequenos esquistossomos entram na circulação periférica e são levados até o coração. Os esquistossomos seguem o fluxo até terem acesso a circulação sistêmica. A migração pelo capilares pulmonares parece ser o maior obstáculo, cerca de 70% são eliminados ainda nesta etapa ⁴⁸. Aparentemente somente os que entram pelas artérias mesentéricas, atravessam os capilares intestinais e alcançam o fígado pelo sistema hepatoportal podem continuar a crescer. Após um período de três semanas de desenvolvimento em sinusóides no fígado, jovens casais esquistossomos se formam e migram para o intestino ou parede da bexiga (de acordo com a espécie) onde inicia-se a produção de ovos e todo o ciclo começa novamente. Estes esquistossomos adultos podem viver de 20 a 30 anos.²

Figura 7 - Casal de *Schistosoma mansoni*²

De modo geral, *Schistosoma spp.* são morfologicamente similares e apresentam dimorfismo sexual. O macho possui menor comprimento e um canal ginecóforo onde a fêmea normalmente reside, onde ocorre a copulação (**Figura**

7). Os vermes adultos vivem em vasos sanguíneos que drenam certos órgãos do abdômen do hospedeiro final, cada uma das três principais espécies apresenta preferência por determinados sítios anatômicos. O *Schistosoma mansoni* apresenta preferência pela veia porta que drena o intestino grosso e quanto mais robusto forem os músculos do macho, maiores as chances do casal viajar contra o fluxo sanguíneo e alcançar veias menores, onde as fêmeas podem depositar seus ovos².

1.1.4 Patogênese, diagnóstico e tratamento da Esquistossomose

Como citado no tópico anterior, a patogênese da esquistossomose se deve, em boa parte, pela presença dos ovos que não alcançaram o lúmen e permanecem nos tecidos. O granuloma que os circundam não se dispersa e estes ovos permanecem por um tempo considerável como uma fonte de antígenos capaz de desencadear a resposta imunológica. Desse modo, a lesão primária associada a esquistossomose é uma reação de hipersensibilidade retardatária (*Delayed Type Hypersensitivity* – DTH -) em torno dos ovos. No entanto, o progresso e o desenvolvimento da doença é resultado de uma complexa interação imunopatológica envolvendo as respostas Th1 e Th2 do sistema imune.

Podemos dividir o avanço clínico da esquistossomose em três fases: migratória, aguda e crônica. A fase migratória envolve os eventos que ocorrem a partir da penetração da cercária até o início da produção dos ovos. Essa fase normalmente é assintomática, embora a penetração das cercária possa produzir dermatite. A fase aguda, também conhecida como a febre Katayama, começa quando a produção de ovos se inicia (aproximadamente, 4 a 10 semanas após a penetração da cercária). A síndrome é marcada por febre, fadiga, dores de cabeça, desconforto gastrointestinal dentre outros sintomas. A exposição a uma grande quantidade de antígenos do *S. mansoni* já é suficiente para ativar a resposta humoral do sistema imune, no entanto, o início da produção de ovos aumenta substancialmente o número de antígenos. A mudança na relação

antígeno-anticorpo acaba levando a formação de grandes imuno-complexos que precisam ser eliminados. Outro aspecto importante é o fato de alguns ovos serem carregados pela circulação portal hepática para o fígado, pulmões, sistema nervoso e/ou outros tecidos. Na maioria dos casos, a resposta imunológica à presença dos ovos é modulada de modo que a reação granulomatosa não se torna tão severa. Por esta razão, a fase crônica normalmente é assintomática, principalmente em moradores de áreas endêmicas, mas é possível que o paciente apresente leve diarreia crônica, leve dor abdominal e letargia².

No entanto, o desenvolvimento de granulomas e fibrose no fígado em virtude da presença dos ovos impedem severamente o fluxo sanguíneo na veia porta em cerca de 8% dos casos de infecção com *S. mansoni* e *S. japonicum*. A medida que os ovos acumulam, a reação fibrótica no fígado continua e a cirrose periportal e hipertensão portal surgem. Uma marcante esplenomegalia também pode ocorrer, parcialmente pela presença dos ovos e parcialmente pela congestão passiva e crônica do fígado. Ascite (acúmulo de líquidos no abdômen) também é comum nestes casos e, em casos mais extremos, a cronicidade da doença pode causar nanismo (**Figura 8**).

O modo de diagnóstico mais utilizado ainda hoje é a detecção dos ovos nas fezes, como para a maioria dos helmintos. No entanto, a produção de ovos de uma fêmea, mesmo para *S. japonicum* (o maior produtor de ovos das três principais espécies), é muito menor que os demais parasitas humanos helmínticos. Por esta razão, as técnicas de concentração associadas a outros métodos de diagnóstico, como biópsia e imunodiagnóstico, são essenciais para o diagnóstico laboratorial. Na fase crônica o número de ovos presente nas fezes é reduzido e muitas vezes inviabiliza a detecção nas amostras, nestes casos ultrassonografia e/ou biópsia do reto, do fígado ou da bexiga podem ser de grande valia. Após o diagnóstico, a conduta terapêutica indicada é a administração de praziquantel, droga efetiva contra a maioria das espécies de *schistosoma*. O mecanismo de ação não é completamente compreendido, mas sabe-se que um efeito importante é o comprometimento da integridade da membrana do tegumento do parasita. O tegumento é uma estrutura complexa que apresenta receptores para antígenos (por exemplo, os do grupo sanguíneo) e praticamente

todos os anticorpos (com exceção de IgD e IgE)⁴⁹. Os agregados de moléculas naturais do hospedeiro ligadas ao tegumento associado à rápida renovação da membrana tegumentar protege o parasita das defesas imunológicas⁵⁰. O praziquantel ao comprometer a estrutura do tegumento permite que o sistema imune detecte a presença do parasita e possa eliminá-lo. Há evidências de que a droga atuaria no canal de Cálcio e isso somado aos efeitos na estrutura do tegumento seriam necessários para seu efeito letal⁵¹.

Figura 8 - Ascite e nanismo (garoto da direita) causado por infecção por *S. japonicum*. Garoto da 13 anos a esquerda; rapaz de 24 anos a direita².

A quimioterapia apropriada pode levar a reversão ou até mesmo a resolução dos danos causados pela fibrose e patologias no trato urinário, mas uma infecção intensa por um longo período pode acabar resultando em danos irreversíveis ao fígado e a bexiga⁵². Além disso, uma deficiência importante no espectro de atividade do praziquantel é a ação moderada contra vermes jovens, o que faz com

que uma segunda administração em um intervalo curto se faça necessária para eliminar por completo a infecção⁵³.

O praziquantel tem sido utilizado em áreas endêmicas para controle de morbidade por mais de 30 anos^{54,55}. Naturalmente, a pressão seletiva nestes locais possibilita o surgimento de parasitas resistentes a droga de escolha e esta possibilidade tem atraído a atenção da comunidade científica^{53,56,57}. Apesar dos poucos isolados resistentes ao praziquantel terem sido detectados, uma redução da susceptibilidade a droga tem sido detectada em muitos focos endêmicos, notavelmente em países da África, como Egito e Senegal⁵⁸⁻⁶¹. A eficácia do praziquantel contra *S. japonicum* continua alta e não mudou depois de três décadas de uso nas principais áreas endêmicas da China e não há evidências diretas de resistência do *S. haematobium*⁴¹. No entanto, em condições de laboratório é possível induzir resistência a droga em *S. mansoni* e *S. japonicum*^{62,63}. Apesar da situação atual não ser alarmante, existe a possibilidade da, em longo prazo, se não for erradicada, resistência a droga se tornar significativa e agravar a esquistossomose como problema de saúde pública.

1.1.5 Metabolismo de Nucleotídeos no *Schistosoma mansoni*

Considerando a possibilidade do surgimento de resistência ao praziquantel e a dificuldade de erradicar a doença, identificar possíveis alvos terapêuticos se faz necessário para facilitar a busca por novos medicamentos. O desenvolvimento racional de fármacos usualmente se baseia na exploração de diferenças bioquímicas e fisiológicas entre o patógeno e o seu respectivo hospedeiro definitivo. No caso do *S. mansoni*, a via de metabolismo de nucleotídeos é potencial detentora de bons alvos terapêuticos. Além disto, a caracterização estrutural dessa via pode trazer informação úteis para melhor entender a síntese de nucleotídeos nos demais organismos, especialmente parasitas humanos. Segue uma breve exposição dos principais experimentos e evidências que

determinaram o que se conhece hoje sobre a síntese de nucleotídeos em *S. mansoni*.

Os primeiros estudos sobre metabolismo de nucleotídeos iniciaram-se na década de 70. O grupo de Senft foi capaz de demonstrar uma rápida incorporação de adenina e não detectaram a incorporação de ^{14}C -glicina e ^{14}C -glicose no anel púrico em extratos de *S. mansoni*⁶⁴, o que viria ser a primeira evidência da ausência da via de novo na síntese de purinas neste parasita. Nos anos seguintes, este mesmo grupo conseguiu determinar as enzimas que compõem a via de salvação de purinas^{3,64-67}. Desse modo, ao contrário de seu hospedeiro definitivo, ficou determinado que a via de biossíntese *de novo* de purinas não está presente neste parasita. Logo, todo o suprimento de purinas deste parasita depende única e exclusivamente da via de salvação³.

Em 2009, o *S. mansoni* teve seu genoma sequenciado e divulgado pelo Sanger Center na Inglaterra⁶⁸. Uma busca pelas enzimas da via de salvação de purinas identificadas na década de 70 permite confirmar a presença de todas elas. A via de salvação de purinas possui um grande potencial como possível alvo terapêutico, considerando a falta da via *de novo* e quantidade de informação já disponível sobre esta via. Estudos estruturais das enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos de *S. mansoni* tem sido interesse de nosso grupo nos últimos anos e até o momento existem estruturas de três enzimas com trabalhos já publicados, são elas: Adenosina Quinase⁶⁹, Purina Nucleosídeo Fosforilase^{70,71} e Adenilato Quinase⁷².

Infelizmente, pouco se sabe sobre as vias de novo e de salvação de pirimidina. Sabe-se que as seis enzimas da biossíntese de novo de UMP e as enzimas da via de salvação de pirimidinas (**Figura 9**) estão presentes em *S. mansoni* e em *S. japonicum*⁴⁻⁶. Apesar dos poucos estudos, foi demonstrada a incorporação de citidina, uridina, uracil, orotato, deoxicitidina e timidina nos ácidos nucléicos do parasita, indicando que estes compostos são precursores para a síntese de ácidos nucléicos⁶. Entretanto não foi observada a incorporação de orotidina, timina ou citosina, o que sugere que estas pirimidinas são pouco ou não são utilizadas para a síntese de ácidos nucléicos no parasita⁶. Extratos de *S. mansoni* podem fosforilar todos os nucleosídeos de pirimidina testados para seus respectivos

nucleosídeos 5'-monofosfato na presença de ATP. De maneira similar todos os pirimidina nucleosídeos 5'-monofosfato foram fosforilados a seus correspondentes di- e trifosfato pela atividade de quinases⁶. As atividades de pirimidina nucleosídeos quinase, nucleotídeo quinase, uridina fosforilase, orotato fosforibosiltransferase, citosina desaminase já foram identificadas neste parasita⁶.

As vias de salvação de pirimidinas e purinas exercem uma função vital para a manutenção dos processos celulares nos quais esse nucleotídeos normalmente estão envolvidos. Deste modo, para uma caracterização completa do metabolismo de nucleotídeos deste parasita, a caracterização das duas vias se faz necessária. A única enzima parcialmente caracterizada (utilizando extrato bruto de verme) da via de salvação de pirimidinas é a uridina fosforilase (UP), em um trabalho realizado há mais de vinte anos⁷³. Esta enzima é chave para o metabolismo de pirimidinas e importante para vários outros aspectos da vida celular.

Figura 9 - Esquema proposto para via de salvação de pirimidinas em *S. mansoni*. NDPK- Nucleosídeo difosfato quinase; NMPK- Nucleosídeo monofosfato quinase; UCK- Uridina citidina quinase; CytDA- citidina desaminase; UK- uracil fosforibosiltransferase; UP- Uridina fosforilase.

1.2 – URIDINA FOSFORILASE

1.2.1 – Uridina Fosforilase: contexto metabólico e importância médica.

Antes mesmo da elucidação da estrutura do DNA, a reação de fosforólise de nucleosídeos de purinas e pirimidinas, reação na qual a ligação C-N glicosídica era desfeita com o auxílio de um íon fosfato e liberava uma base livre e ribose-1-fosfato, era investigada e considerada de grande importância para a manutenção das funções celulares. Em 1924 foi publicado um estudo que identificava a catalise enzimática dessa reação em purinas e pirimidinas⁷⁴ e logo ficou claro que havia dois tipos de nucleosídeos, isto é, purinas e pirimidinas^{75,76}. Essas investigações abriram caminho para a descoberta e caracterização da Uridina Fosforilase (UP) (E.C. 2.4.2.3). A UP catalisa a fosforólise reversível da uridina, que resulta na formação de uracil e ribose-1-fosfato (**Figura 10**). Todos os reagentes e produtos envolvidos nesta reação são precursores diretos para produção de vários compostos metabólicos essenciais para manutenção da vida celular. A uridina é um importante precursor na via de salvação de pirimidinas⁷⁷, no metabolismo de carboidratos e biossíntese de purinas, estes dois últimos através da fosforólise. Através da UP, a uridina pode ser utilizada para fornecer pentose-1-fosfato para utilização na via das pentoses fosfato, auxiliando a manutenção dos níveis de ATP, função importante na ocasião de um déficit de oxigênio para fosforilação oxidativa⁷⁸. A uracil pode ser útil como precursor na produção de β -alanina, um precursor limitante na produção de carnosina (dipeptídeo muito importante por sua atividade antioxidante)⁷⁹. Recentemente um estudo que avaliou os efeitos da superexpressão da UP1 de camundongo (mUP1) demonstrou que a diminuição da concentração de uridina favorece o surgimento da esteatose microvascular⁸⁰. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que existe uma relação entre os níveis de uridina e o padrão de acetilação de proteínas envolvidas em vários processos. É plausível que as mudanças de acetilação dessas proteínas hepáticas seja um mecanismo que permita ligar os níveis de uridina a supressão do metabolismo de lipídios⁸⁰. A acetilação como mecanismo geral de controle celular para adaptação

do metabolismo energético é uma ideia que tem ganhado força⁸⁰. Além disso, há relatos de regulação hepática da expressão gênica da UP por múltiplos receptores nucleares ligados ao metabolismo de lipídios⁸¹. Apesar de atualmente os mecanismos moleculares que viabilizam a relação entre uridina e lipídios serem desconhecidos, a uridina fosforilase é uma enzima importante para manter esta relação. Dessa forma, UPs são instrumentos muito úteis dentro do contexto metabólico celular.

A UP é amplamente distribuída entre animais e bactérias, com a maioria dos vertebrados apresentando duas versões, UP1⁸² e UP2⁸³. Análises filogenéticas sugerem que a duplicação do gene ocorreu cedo na história evolutiva dos vertebrados e a perda da UP2 tem ocorrido esporadicamente⁸⁴. As UPs humanas (hUP) compartilham ~62% de identidade, mas pouco se sabe sobre a hUP2. Em contrapartida, a hUP1 é relativamente bem caracterizada^{79,85-87}. Uma das principais diferenças conhecidas é a distribuição da expressão mais limitada da hUP2, predominantemente no rim e menos intensa no fígado e baço⁸³. Há indícios que a UP2 murina (mUP2) é alvo de regulação de vários agonistas de receptores nucleares hepáticos e menos expressa no rim e intensamente expressa no fígado^{81,88}. Além disso, a mUP2 apresenta elementos responsivos ao fator nuclear hepático 4α (HNF-4α), um importante fator de transcrição que governa a expressão de genes envolvidos em várias vias metabólicas⁸¹. A identificação da regulação da expressão da UP2 baseada nestes elementos e o fato de β-alanina servir como precursor na síntese de ácidos graxos sugere uma relação entre uridina e o metabolismo de lipídios viabilizada por esta enzima nos tecidos nos quais é expressa. Apesar de não se conhecer a razão pela qual duas versões dessa enzima sejam necessárias, é plausível que a existência de duas formas diferentes da UP esteja relacionada as necessidades de regulação em um determinado tecido.

Figura 10 - Reação de fosforólise reversível da uridina

De modo geral, quanto maior o número de divisões que uma célula precisa realizar, maior será a necessidade por uridina e timidina e, conseqüentemente, a necessidade da atividade da UP. Em células tumorais humanas, há indícios de que atividade da UP aumenta por um fator de 10 a 1000 vezes, dependendo do tipo de tumor^{89,90}. Em células multipotente e imaturas, a atividade da UP costuma ser maior quando comparada com células diferenciadas⁹⁰. Além da manutenção do *pool* adequado de nucleotídeos, essa enzima é importante para a proteção contra isquemia⁷⁸ e regulação do metabolismo de lipídios. Conseqüentemente, a expressão da UP precisa variar de acordo com as necessidades de cada tipo de tecido e com as condições ambientais imediatas. De fato, a aplicação não racional de inibidores de UP, principalmente se houver baixa seletividade tecidual, podem causar complicações. Uma vez que, em situações normais, a maior parte das bases pirimídicas em organismos complexos é sintetizada pela via de novo⁹⁰, a principal consequência negativa da inibição da UP aparenta residir na influência no metabolismo de lipídios e diminuição de recursos para a via das pentoses fosfato, crucial para resistência a isquemia. Desse modo, se um organismo parasitário sensível a inibição da UP estiver presente, a ocasional inibição colateral da enzima do hospedeiro definitivo não será tão onerosa. Notavelmente, a inibição da UP é letal para bactérias (como *Salmonella typhimurium*)⁹⁰ e parasitas como *Giardia lamblia* e *S. mansoni*^{73,90,91}. A exposição do *S. mansoni* à 2,2'-anidrouridina, um eficiente inibidor da UP é letal⁷³, o que pode viabilizar a utilização da UP como alvo terapêutico no combate a infecção pelo *S. mansoni*.

1.2.1.1 Importância da UP para o efeito protetor contra isquemia, metabolismo de lipídios e acetilação de proteínas

A atividade da UP é crucial para manutenção do *pool* de nucleotídeos para manutenção das funções celulares, como por exemplo, produção de ácidos nucleicos e nucleotídeos importantes para várias vias de sinalização.

Especialmente em organismos que não possuem a via de síntese *de novo*, a necessidade de manutenção da atividade da UP na via de salvação de pirimidinas é um requerimento mandatório em todas as células. No entanto, um papel menos óbvio é a importância da atividade da UP para proteção contra isquemia, regulação do metabolismo de lipídios e acetilação de proteínas. Segue um breve resumo do estado atual do conhecimento sobre o real papel desta enzima nestes processos.

A razão dos vertebrados manterem duas isoformas da UP ainda é incerta. Mas, sabe-se que a expressão da hUP2 é de modo geral mais limitada (rim, fígado e baço) que o seu homólogo⁸³, a mUP2 é alvo de vários agonistas de receptores nucleares hepáticos^{81,88}, e ambas apresentam elementos responsivos ao Fator Nuclear Hepático 4 α , o que sugere uma conexão entre uridina e o metabolismo de lipídios mediado pela UP, especialmente UP2⁹². Outro aspecto interessante das hUPs é a expressão normalmente elevada da hUP1 em células tumorais⁹³, em contrapartida, a hUP2 normalmente não é expressa nestas células⁸³. Diante da importância da hUP1 para o metabolismo de pirimidinas e a necessidade elevada de replicação das células tumorais, a expressão aumentada da hUP1 neste contexto é algo natural. A não expressão da hUP2 neste tipo de célula e a sensibilidade ao potencial redox do ambiente celular fortalece a impressão que esta isoforma pode possuir uma importância menor para o metabolismo de pirimidinas e maior para outros aspectos da vida celular.

Experimentos com neurônios submetidos a quadros de isquemia *in vitro* e *in vivo* demonstraram a importância dos níveis de Uridina como protetores de neurônios diante de quadros como este, possivelmente via a atividade da UP⁷⁸. A fosforólise de nucleotídeos no cérebro, liberando ribose-1-fosfato, pode subsidiar a produção de ribose-5-fosfato e conversão a 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP), criando uma fonte de energia alternativa⁹⁴. Uma vez que o cérebro não sintetiza nucleotídeos pela via *de novo*, o balanço destes nucleotídeos é mantido pela via de salvação de purinas e de anéis pirimídicos⁹⁵, assim como ocorre no *S. mansoni*. Desse modo, o balanço entre catabolismo e anabolismo de Uridina é mantido pela UP, que catalisa etapa de entrada do catabolismo, e a Uridina quinase (UK), enzima que catalisa a etapa de entrada no processo de anabolismo

(produção de UTP). Experimentos em camundongos demonstraram que a inibição da UK por níveis de UTP e CTP que excedem o fisiológico, diminui a utilização da salvação de pirimidinas e desloca o equilíbrio da reação reversível da UP no sentido da fosforólise da uridina⁷⁸. Além de manter a homeostase da uridina, o sistema enzimático UP-UK, possui um papel adicional na regulação recíproca entre as vias de salvação da purina e pirimidina no cérebro⁹⁶. A inibição da UP *in vitro* e *in vivo* em neurônios e astrócitos de camundongos impede o efeito protetor da uridina na sobrevivência neuronal e nos níveis de ATP. Outro fato importante é que o bloqueio da captação celular de uridina também abole este efeito protetor. Apesar de não totalmente compreendido, o efeito protetor da uridina é mediado pela ativação da glicólise mediada pela ribose-1-fosfato e PRPP, existem evidências que fortalecem a hipótese da UP ser uma importante mediadora deste efeito⁷⁸. Notavelmente, a uridina tem habilidade de aumentar o tamanho de neuritos, acelerar a síntese de fosfolípidios e aumento dos níveis de proteínas do neurofilamento NF-M e NF-70⁹².

A existência de regulação da expressão gênica da UP específica no fígado por múltiplos receptores nucleares envolvidos na regulação do metabolismo de lipídio já era conhecida⁸¹, mas somente em um trabalho publicado recentemente foi demonstrado experimentalmente que a uridina é uma molécula crítica para evitar esteatose hepática⁸⁰. A expressão excessiva da mUP1 causa diminuição dos níveis endógenos de uridina que, por uma mecânica ainda desconhecida, causa esteatose microvascular hepática no camundongo⁸⁰. É plausível a participação da β -alanina como mediadora deste processo nos vertebrados.

Outro aspecto importante é o fato que a suplementação de uridina induz mudanças no perfil de acetilação de proteínas hepáticas, especialmente em proteínas envolvidas no metabolismo celular, reações de oxidação-redução e antioxidantes⁸⁰. O conceito da acetilação como um mecanismo geral de controle de adaptação celular diante da necessidade de mudanças no metabolismo celular tem crescido⁹⁷ e consiste em uma modificação pós genômica prevalente em praticamente todas as enzimas envolvidas no metabolismo energético celular hepático⁹⁸. Um possível catabólito que viabilize a conexão entre UP e a regulação via acetilação é a β -alanina. No fígado, células não parenquimatosas primeiro

transformam uridina em uracil e, em seguida, hepatócitos enriquecidos com diidrouracil desidrogenase implementam as etapas subsequentes de degradação de uracil ao catabólito final β -alanina⁷⁹. A β -alanina é importante para o sistema nervoso central, possivelmente atuando como neurotransmissor⁹⁹, e pode servir de precursor na síntese de acetil-CoA, importante para várias vias metabólicas, especialmente ciclo de Krebs, para a síntese de ácidos graxos e para o processo de acetilação de lisinas¹⁰⁰. Apesar de incerto, o fornecimento de β -alanina pode ser o elo entre a atividade da UP e as mudanças no padrão de acetilação. De modo que a regulação da atividade desta enzima é uma necessidade central para a manutenção da normalidade dos mais diversos processos celulares.

Apesar de pouco se saber sobre os mecanismos que conectam a atividade da UP com estes efeitos, não há dúvidas que esta enzima possui um papel importante para vários aspectos da vida celular de neurônios. Diante deste quadro é razoável supor que existe uma necessidade maior por uma regulação desta enzima em resposta ao ambiente se comparada ao contexto constitutivo do seu papel no metabolismo de nucleotídeos. É possível que a razão de manter uma segunda isoforma da UP expressa em determinados tecido esteja relacionada a função desta enzima em contextos completamente diferentes do metabolismo de nucleotídeos.

1.2.2 Uridina Fosforilase: Estrutura e função

1.2.2.1 Super-família Nucleosídeo Fosforilases

A UP se enquadra na família NP-1, por possuir várias características comuns com proteínas pertencentes a esta família. Antes de discutirmos as particularidades desta enzima, se faz necessário realizar uma breve exposição das características estruturais dessa família.

As enzimas que catalisam fosforólise da ligação glicosídica de nucleosídeos apresentam apenas dois tipos de enovelamentos¹⁰¹. De modo que é possível enquadrá-las na superfamília Nucleosídeo Fosforilase e subdividi-las em duas famílias, NP-1 e NP-2. Membros da família NP1 normalmente são proteínas com um único domínio que apresenta um enovelamento α/β , podendo apresentar estrutura quaternária hexamérica (comum em bactérias) ou trimérica (comuns em mamíferos) e algum grau de especificidade para uma variedade de purinas e pirimidinas. Membros da família NP-2 normalmente apresentam dois domínios α/β conectados por um pequeno domínio de α -hélices, se apresentam como homodímeros e podem apresentar especificidade por timidina, normalmente em organismos complexos (por exemplo, mamíferos), ou capacidade de catalisar timidina e uridina, usualmente em organismos de baixa complexidade¹⁰¹.

Apesar das diferenças na estrutura quaternária entre espécies de membros da família NP-1 e NP-2, o enovelamento das subunidades é conservado entre eles. O enovelamento normalmente consiste de um barril β distorcido cercado de várias alfa hélices e o sítio ativo é composto de dois bolsões adjacentes, um de ligação ao fosfato e outro de ligação a nucleosídeos, ambos formados por resíduos de mais de uma cadeia (**Figura 11**). O sítio normalmente é formado por resíduos da folha- β central, loops conectivos e da subunidade adjacente¹⁰¹. Apesar das divergências na sequência entre os membros da família NP-1, o motivo estrutural composto pelas folhas- β é uma constante na estrutura de todas as estruturas determinadas até o momento. Motivos semelhantes são encontrados também na família das GTPases, que também necessitam se ligar a nucleosídeos. É plausível que este motivo seja importante para manter a relação entre a ligação dos substratos (fosfato e nucleosídeos) e a catalise da fosforólise¹⁰¹. Adicionalmente, resíduos de pelo menos uma das hélices normalmente contribui para o sítio de ligação ao fosfato. Uma outra região altamente conservada na família NP-1 inclui loops conectivos entre duas fitas β , que normalmente contribuem com resíduos para o *pocket* de ligação ao fosfato (**Figura 11**)¹⁰¹.

Um mecanismo catalítico comum na família NP-1 normalmente envolve a formação de um íon oxocarbênio intermediário, seguida de um ataque nucleofílico S_N1 no carbono anomérico do açúcar^{81,102}. Um próton é doado a base, o que

permite a formação de uma ligação de hidrogênio entre a enzima e a base nitrogenada do nucleosídeo. O fluxo de elétrons proveniente da ribose (ribosil O4) estabiliza a tração eletrônica da base nitrogenada, de modo que a ligação glicosídica seja alongada, produzindo um íon oxocarbênio intermediário. O ataque nucleofílico Sn-1 no C1 da ribose realizado pelo nucleófilo (fosfato, no caso de UPs e PNPs) finaliza a reação. Uma vez que os mecanismos de reação são semelhantes, vários resíduos do sítio ativo são conservados entre diferentes membros da família NP-1. UPs e PNPs costumam compartilhar um tripleto de argininas altamente conservadas no sítio de ligação ao fosfato¹⁰²

Figura 11 - Algumas características estruturais conservadas na super-família NP. A) barril β distorcido cercado de várias alfa hélices, B) sítio ativo é composto de dois bolsões adjacentes, uma de ligação a uridina (roxo) e outro ao fosfato (amarelo). Imagens geradas utilizando o Pymol baseado na estrutura da Uridina Fosforilase de *Toxoplasma gondii* (3MB8).

1.2.2.2 Aspectos estruturais da UP

A estrutura da proteína e do gene da UP varia em um amplo espectro entre os organismos, apesar de sua onipresença. No entanto, baseado nas UPs de

estrutura conhecida, é possível identificar algumas características comuns. Por exemplo, monômeros de UPs pertencem a classe α/β com arquitetura de sanduíche $\alpha/\beta/\alpha$ ⁹⁰. O sítio ativo sempre é formado por resíduos de dois monômeros, desse modo, é necessário um homodímero para obter uma UP funcional. É possível dividir o sítio ativo em pelo menos três regiões: uma região de ligação a base pirimídica, de ligação a pentose e de ligação ao fosfato. Os resíduos que fazem contato com a uridina (normalmente, Gln e Arg) permitem o reconhecimento do anel pirimídico da uridina (**Figura 12**) e naturalmente são bem conservados em UPs de vários organismos. Pela própria configuração do sítio, a afinidade pela uridina (uracil) excede a timina. A presença do grupo metil na timina dificulta a formação de um complexo estável que acaba se refletindo nas constantes de reação enzimática desse substrato⁹⁰. Um outro aspecto estrutural importante é o loop próximo ao sítio que pode mudar significativamente de conformação dependendo do estado funcional, ligado ao substrato (conformação fechada – bloqueio do acesso do solvente ao sítio ativo) ou não ligado ao substrato (conformação aberta). É plausível que as duas conformações existam em solução na ausência do substrato⁹⁰.

Recentemente, baseado na utilização de resíduos diferentes para estabilizar a carga negativa da base nitrogenada foi demonstrado que UPs bacterianas, que normalmente se apresentam na forma de hexâmeros, podem ser subdividas em duas subfamílias (nomeadas de UP-1 e UP-2), uma mais comum em bactérias Gram-positivas e a outra, em bactérias Gram-negativas¹⁰². Para evitar ambiguidades com a nomenclatura de isoformas da UP, essas famílias serão referidas como UPg+ e UPg-, para as gram positivas e negativas, respectivamente, ao longo do texto. Apesar de estruturalmente semelhantes e iguais em termos de especificidades por substratos, a utilização destes resíduos diferentes parece ter um impacto significativo na eficiência da enzima. A UP de *E. coli*, uma bactéria gram negativa, é sete vezes mais eficiente que a UP de *Streptococcus pyogenes*, uma bactéria gram-positiva¹⁰². Outra diferença está no ataque nucleofílico que pode ser no O4 ou O2 para UPg+ e UPg-, respectivamente^{101,102}.

Em mamíferos, pouca informação há sobre diferenças entre isoformas, no entanto, a hUP2 parece apresentar um mecanismo de regulação sensível ao potencial redox do ambiente celular⁹². Na hUP2, uma arginina (R100) que contribui para a ligação ao fosfato só é capaz de auxiliar a ligação após uma ponte dissulfeto ser desfeita (entre C95 e C102), que permite o posicionamento correto da arginina. Na presença dessa ligação dissulfeto, um aspartato (D90) acaba impedindo a ligação ao fosfato, de modo que a enzima só se torna funcional após as cisteínas serem reduzidas ⁹². Essa descoberta abre a possibilidade da função da segunda isoforma estar relacionada com a resposta celular a situações que envolvem estresse oxidativo.

Figura 12 - Mecanismo comum de ligação ao anel pirimídico de Uridina Fosforilases. O mecanismo baseia-se na formação de ligações de hidrogênio entre uma arginina e o O2 e duas entre Glutamina e o O4 e N3. Imagem gerada via Pymol baseado no modelo da Fosforilase de *Salmonella typhimurium* (PDB: 2HWU).

1.2.3 *S. mansoni* e UP

Em condições fisiológicas, a concentração de uridina no plasma é estritamente mantida entre 4-6 μM em quase todos os organismos. Uma dose não fisiológica de uridina exógena (até 250mg/kg) pode aumentar a concentração

plasmática de uridina para 1mM, mas esses valores diminuem para menos de 10 μ M após o período de uma hora ⁹⁰. Desse modo o plasma sanguíneo humano corresponde a uma rica fonte de uridina para o *S. mansoni*, e os mecanismos para manutenção dos níveis de uridina diminuem o impacto do consumo deste recurso pelo parasita.

Existem poucos trabalhos sobre o metabolismo de nucleotídeos em *S. mansoni* e a atividade de uridina fosforilase foi a única atividade de clivagem de nucleosídeos pirimídicos detectada em extratos de *S. mansoni* ⁷³. No estudo publicado em 1988 foram caracterizadas aspectos cinéticos da enzima isolada do extrato e determinou-se que 5-(benziloxibenziloxibenzil) aciclouridina (BBBAU) é um inibidor desta enzima, no entanto inibidor não muito eficiente da equivalente humana (hUP1)⁷³. Neste mesmo estudo, baseado na comparação entre a atividade inibitória de BBBAU e 5-benzilaciclouridina (BAU), o autor sugere a existência de um bolsão hidrofóbico adjacente ao sítio de ligação à posição 5 do anel pirimídico maior que o sugerido na época para a UP de mamíferos ⁷³. Além desse estudo, não houve nenhum outro trabalho publicado na literatura sobre a UP de *S. mansoni*.

Uma busca no genoma do *S. mansoni* permite identificar dois genes putativos para UP, Smp_082430 (smUP-A) e Smp_082420 (smUP-B), cuja sequência de nucleotídeos nas extremidades da região codificadora é a mesma. Ambos codificam uma proteína com 297 aminoácidos e diferem apenas em 21 posições (92% de identidade) (**Figura 13**) e compartilham 38% de identidade quando comparada com o homólogo humano. Assim como para a maioria das enzimas do metabolismo de nucleotídeos do *S. mansoni*, há pouca ou nenhuma informação estrutural dessas enzimas disponíveis. Considerando a importância dessas enzimas dentro do contexto metabólico do *S. mansoni*, o presente estudo tem como objetivo levantar informações sobre os aspectos funcionais e estruturais destas smUPs.

```

Smp_082420 MATVQPIVNSHLSLSEDEDVFHHFGFTTKSFDFKEKFGDVKFVCVCGSSGRIHNFAISMAK 60
Smp_082430 MATVQPIVNSHLSLSEDEDVFHHFGFTTKSFDFKEKFGDVKFVCVCGSSGRIHNFAISMAK 60

Smp_082420 LAGLALPVENIAGSHARFVLYKVDHILFADHGIIGIPSTLIIMHEVTKLLYAGCKDVLFI 120
Smp_082430 LAGLALPVENIAGSHARFVLYKVDHILFADHGMGIPSAIIMLHEVTKLLHYAGCKDVLFI 120

Smp_082420 RLGTSDGLGVKPGTIVLSDRCVNTKLEPYNELCILGKPVRRQTKVDSNAVNELKKLSEN 180
Smp_082430 RLGTSGGLGVKPGTIVLSDRCVNTKLEPYNELCILGKPVRRQTIVDLNTVNELKKLSEN 180

Smp_082420 SLKCSVVVGGTITANDFYEEIGRLNGSICTFSKEEKLAFLQSVYDHGIRNMEMEGAAITS 240
Smp_082430 SLECSVVVGGTIAANDFYEEQGRLDGSICTFSKEEKLAFLQSAIEHGIRNMEMEGTAITS 240

Smp_082420 HCYLTGHRAILVCVTVVRLEDEVTTSTDEFKLFELPGQLVGEYLKRNGIIVR 296
Smp_082430 HCYLTGHRAILVCVTAVNRLEGDQITISTDEFTLFAQRPGQLVGEYLKRNGIIVR 296

```

Figura 13 - Alinhamento entre os aminoácidos dos genes Smp_082420 e Smp_082430 isoformas da smUP de *Schistosoma mansoni*. Identidade = 92%.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Por estar inclusa em um projeto maior de caracterização estrutural e funcional das vias de salvação de purinas e pirimidinas, as smUPs já tinham as condições de clonagem, expressão, purificação e cristalização padronizadas, além da coleta de dados dos cristais obtidos já realizadas a partir do ano de 2010. De modo que o presente trabalho consiste na continuação deste projeto, isto é, refinamento das estruturas pendentes e análise e interpretação das estruturas obtidas. Por fins de completeza e por não ter sido descrito em outro lugar segue uma descrição dos procedimentos de clonagem, expressão, purificação, cristalização e coleta de dados realizadas anteriormente e o processo de refinamento e análise das estruturas desenvolvido neste trabalho.

2.1 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM

Para a amplificação do gene Smp_082430 (smUPa) e Smp_082420 (smUPb) referente à UP de *S. mansoni* (SmUP) foi utilizada uma biblioteca de cDNA gerada a partir do RNAm total do verme adulto utilizando o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System da Invitrogen segundo instruções do fabricante. O mRNA foi fornecido pelo Prof. Ricardo DeMarco (Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo – IFSC/USP). No desenho dos primers foram inseridos sítios de restrição, de modo a permitir a ligação nos vetores de expressão pET28a, pré-digerido com as enzimas de restrição NdeI e XhoI, para a produção da proteína recombinante. Os vetores pré-digeridos, e os insertos purificados, utilizando o kit *Promega Wizard SC Gel and PCR Clean, Up*, foram submetidos a uma reação de ligação (Tampão Ligase 2x, Inseto purificado, 50 ng/μL do Vetor e T4 DNA ligase; *overnight*; 4°C). O produto da reação foi utilizado para transformação das bactérias competentes *E. coli BL21 codon plus* via técnica de choque térmico (exposição da bactéria + vetor-inseto a 42°C por 90 segundos

seguido rápida transição para 0° por 5 minutos). Em seguida, após a adição de 250µl de meio LB, as bactérias foram incubadas (37°C; 1h; 125rpm), plaqueadas em meio LB com adição de kanamicina 50µg/ml e incubadas novamente a 37°C por 14 horas. Após a incubação, o crescimento de colônias isoladas na placa foi observado e a presença do inserto nestas foi detectada por PCR de colônia e confirmada por sequenciamento (método de terminação de cadeia de DNA por incorporação de didesoxinucleotídeos com iniciadores fluorescente via o Kit *Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing with 7-deaza-dGTP* da Amersham/Pharmacia).

2.2 Expressão e purificação

A indução da expressão das proteínas nas bactérias transformadas foi realizada utilizando 500mL de meio de cultura 2XYT (16g de triptona, 10g de extrato de levedura e 5g NaCl por litro) inoculado com 10mL de cultura crescida *overnight*, suplementado com kanamicina 30 µg/ml e clorafanicol 50 µg/ml para a BL21 *codon plus*. Os frascos contendo as bactérias transformadas ficaram sob agitação a 37°C por 4 horas. Uma vez atingida a densidade óptica desejada ($\geq 0,5$), foi adicionado o indutor de expressão, o IPTG 100µM/ml. Após a indução, os frascos contendo as bactérias transformadas com smUPa permaneceram por 4 horas sob agitação a 37°C, enquanto as transformadas com smUPb ficaram sob agitação a 18°C por 16h, pois, sob 37°C, a smUPb se tornava insolúvel. Após o processo de expressão, as bactérias foram lisadas por sonicação (pulsos de 1 minuto entre intervalos de 30 segundos), em seguida centrifugadas (20'; 9000g; 4°C) e o extrato bruto obtido submetido a cromatografia de afinidade. Para a realização da cromatografia foi utilizada uma coluna de resina cromatográfica de cobalto Co-NTA agarose fornecida pela *ClonTech*. Após a preparação da coluna com tampão de lise (50mM de Tris; 2mM de Sulfato de Amônio; 300mM de NaCl; 10mM de Imidazol; 5mM de β-mercaptoetanol), o extrato bruto foi adicionado à coluna. Um volume de 20 mL de tampão de lavagem (50mM de Tris; Sulfato 2mM; 300 mM de NaCl; 20mM de Imidazol; 2,55 mM de β-mercaptoetanol) foi aplicado

gradativamente na coluna com o objetivo de eliminar impurezas contidas na amostra que são incapazes de interação com a resina. A proteína de interesse contendo a 6HisTag foi então extraída com a aplicação de 10mL do tampão de eluição (50mM de Tris; 2mM de Sulfato; 2mM de NaCl; 200mM de Imidazol; 5mM de β -mercaptoetanol). A pureza das amostras obtidas após a eluição da resina foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida. A concentração total de proteína em cada amostra foi estimada pelo método de Bradford. As amostras são posteriormente dialisadas em tampão (20mM Tris; pH 7.4; 200mM de KCl e 5mM de β -mercaptoetanol) para a retirada do imidazol excedente no tampão de eluição, e então concentradas por centrifugação até a concentração final de ~10mg/mL. A remoção da 6HisTag foi feita através da adição de trombina (1:200) em uma alíquota da amostra de proteína purificada por aproximadamente 10 horas. A 6HisTag livre em solução, foi removida por diálise.

2.3 Cristalização

Os ensaios iniciais de cristalização foram realizados utilizando a técnica de difusão de vapor em gota sentada, em placas de cristalização *CrystalQuick* de 96 poços. Esse processo utilizou-se da tecnologia automatizada (robô Honeybee), permitindo a varredura de uma maior variedade de condições e consumindo menores quantidades de reagentes em comparação aos procedimentos realizados manualmente. Ao todo foram triadas 864 condições diferentes, disponíveis em kits comerciais, *Hampton Research* (3 kits de 96 condições), e *Qiagen* (6 kits de 96 condições). As gotas montadas neste experimento possuem volume final de 1,4 μ L (0,7 μ L de proteína + 0,7 μ L de solução precipitante).

As condições que apresentaram resultados promissores foram posteriormente otimizadas. Para isso, foram conduzidos experimentos de gota suspensa montados manualmente em placas de cristalização com 24 poços. As gotas montadas neste experimento possuem volume final de 4,0 μ L (2,0 μ L de proteína + 2,0 μ L de solução precipitante). Para levantar informações sobre a potencialidade das smUPs de interagir com diferentes substratos, foram

realizados ensaios de cristalização com 2mM com alguns dos diferentes ligantes (timidina, timina, uracil, uridina, ribose-1-fosfato e 5-fluoracil) considerados relevantes para o contexto metabólico no qual as UPs se inserem.

2.4 Coleta e processamento

Os cristais referentes aos sistemas smUPa e smUPb foram coletados em três diferentes lugares de acordo com a disponibilidade de cada uma das fontes de luz em questão. O cristal referente a estrutura smUPb_{apo} (smUPb sem ligante) foi coletado no LNLS no ano de 2009, utilizando o detector CCD MarMosaic 225, com comprimento de onda 1.459Å. Três conjuntos de dados de difração de diferentes cristais foram coletados. Os cristais da smUPa obtidos foram coletados no *Diamond Light Source* (DLS) em Oxfordshire – Inglaterra, na linha de luz I04 e I04-1, equipada com o detector CCD Quantum 315r e Pilatus 2M, respectivamente. Outro cristal referente a estrutura da smUPb-citrato (estrutura da smUPb com citrato presente em um dos sítios) foi coletado no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP) utilizando um equipamento Rigaku MicroMax 007 acoplado a uma placa de imagem Raxis IV++. Para a coleta de dados de difração a baixa temperatura, foram preparadas soluções de mesma composição das que originalmente são obtidos os cristais, com a adição de glicerol (20% do volume total) para a crio proteção dos cristais. Os cristais foram transferidos das soluções originais para a solução crio protetora com a ajuda de um *loop* (pequena alça de náilon), e logo em seguida foram resfriados em nitrogênio líquido, onde permaneceram estocados até a realização da coleta.

Em todos dos casos a temperatura de coleta foi mantida em 100K. Os conjuntos de dados foram processados no programa iMOSFLM¹⁰⁴, com escalonamento via SCALA¹⁰⁵, XDS¹⁰⁶ e Xia2¹⁰⁷. O conteúdo estimado de moléculas presentes na unidade assimétrica foi estimado utilizando coeficiente de Matthews, que é definido como a razão entre o volume da unidade assimétrica (UA) e a massa do seu conteúdo (em Å³/Da) e este valor reflete a porcentagem

de solvente na cela unitária. A porcentagem de solvente é útil para determinar a probabilidade da UA ser composta por um determinado número de moléculas.

2.5 Substituição Molecular, refinamento, validação e análise das estruturas

Todos os conjuntos de dados coletados neste trabalho foram resolvidas por substituição molecular através do programa Phaser¹⁰⁸. A estrutura da UP humana (3EUE), que compartilha ~62% de identidade com as smUPs, foi modificada através do programa Chainsaw¹⁰⁹ e Coot¹¹⁰. O modelo resultante foi utilizado na substituição molecular para resolver a primeira estrutura da smUP, a smUPb-*citrato*. Esta nova estrutura da smUPbapo foi utilizada na substituição molecular dos demais conjuntos de dados da smUPb e smUPa. Para os modelos cristalográficos obtidos neste trabalho, os ciclos de refinamento foram realizados no programa Phenix¹¹¹. A estratégia de refinamento consistiu em inicialmente realizar um refinamento de corpo rígido e *simulated annealing* em coordenadas cartesianas para um primeiro ajuste geral do modelo. Em seguida ciclos de refinamento utilizando as seguintes estratégias globais: o refinamento no espaço real; B-fatores e ocupâncias individuais; coordenadas xyz, um refinamento cartesiano padrão da geometria do modelo e concordância com os dados de raios-X; Parametros de *Translational/ Libration/Screw* (TLS), análise da flexibilidade local ou movimentos entre domínios através de múltiplos segmentos de cadeias individuais, modelados como corpos rígidos, submetidos a movimento vibracional TLS e classificados de acordo com a concordância com o parâmetro de deslocamento atômico. Para otimização do refinamento foram utilizados algoritmos utilizado no PHENIX para automatizar os seguintes procedimentos: determinação automática da posição de moléculas de água; para ajuste automático dos ângulos torcionais de acordo com a concordância entre a distribuição das conformações no PDB e o mapa de densidade eletrônica; determinação da melhor orientação de Asn, Gln e His baseada em ligações de hidrogênio, uma vez que a pequena diferença do número de elétrons entre C, N e O dificulta a determinação da orientação destes aminoácidos baseada apenas no

mapa de densidade eletrônica. A concordância geral entre os dados de difração e o modelo foi quantificado pelo *R-value* (ou R_{work}), que é calculado utilizando o fator de amplitude observado (F_{obs}) e calculado a partir do modelo (F_{calc}), e o R_{free} , calculado da mesma forma que o R_{work} , no entanto, utilizando apenas um conjunto de reflexões excluído do qualquer refinamento subsequente para viabilizar uma validação cruzada. Aspectos estereoquímicos dos modelos foram validados via MolProbity.

Para obter indicativos sobre a compatibilidade entre a estrutura quaternária apresentada no cristal e a presente em solução, foi utilizado o PISA¹¹². Para comparar as estruturas das smUPs com outras estruturas de UPs disponíveis foi realizado alinhamento estrutural e cálculo do RMSD e Tmscore utilizando o Tmalign¹¹³. As figuras geradas de estruturas tridimensionais e representações de densidade eletrônica foram feitas com o programa PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.5 Schrödinger, LLC*).

3 Resultados e Discussão

3.1 Expressão, purificação, cristalização e coleta de dados

As duas isoformas, smUPa e smUPb foram expressas e purificadas e, nos dois casos, o rendimento médio obtido foi de 30mg/L. A purificação em bancada feita em uma única etapa, através da coluna de afinidade, mostrou-se satisfatória para a obtenção de ambas a isoformas da enzima uridina fosforilase com considerável grau de pureza. A presença da 6Histag fusionada à proteína de interesse mostrou-se prejudicial para os ensaios de cristalização, de forma que não foram obtidos cristais das isoformas fusionadas com a 6Histag. Somente após clivagem do 6Histag com trombina (1:200) e a remoção da mesma por diálise, houve sucesso nos testes de cristalização.

Cristais da smUPa foram obtidos na condição B9 do kit PEGII (20% PEG 400, 100mM MÊS, 20% Isopropanol, 100mM Acetato de Sódio e pH 6,5). Cristais da smUPb na condição C7 do fatorial Classic (20% PEG 4000, 20% de isopropanol em 100mM de tampão citrato de sódio pH5.6) foram obtidos (**Figura 14**). A otimização desta condição foi realizada variando-se o pH do tampão citrato (5,2; 5,4; 5,6; 5,8 e 6,0), as concentrações de PEG4000 (20, 18 e 16%) e de isopropanol (20,0; 17,5 e 15%). Cristais da smUPa na condição Index F6 (200mM sulfato de amônio, 100mM de Bis-Tris pH5.5, 25% PEG3350) foram obtidos. A otimização variando-se o pH (5.1 a 5.9 com intervalos de 0.2), concentração de PEG3350 de (19 a 25% com intervalos de 2%), e com a presença e ausência de sulfato. Os cristais otimizados apresentaram faces bem formadas e um tamanho médio de 0,3mm. Os cristais das smUPs na presença de 2mM timidina, timina, uracil, uridina e 5-fluoracil foram obtidos por co-cristalização nas respectivas condições de cada isoforma. Não foram obtidos cristais de nenhuma das proteínas com ribose-1-fosfato.

Os conjuntos de dados obtidos a partir dos cristais de smUPb e os obtidos por co-cristalização utilizados para obtenção das estruturas apresentadas neste

trabalho foram coletados no laboratório de Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP) e no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron(LNLS). Os conjuntos de dados obtidos a partir dos cristais da smUPa foram coletados no *Diamond Light Source*.

Figura 14 – (A) Gel de poliacrilamida 15% corado por coomassie blue com as alíquotas da purificação da UPb em coluna de cobalto e cristais da smUP obtidos. Raia 1: Marcador de peso; molecular; Raia 2: extrato bruto; Raia 3 e 4: eluição da UP; Linha 5: eluato. B) Cristais da smUPb obtidos na condição C7 do fatorial Classic (20% PEG 4000, 20% de isopropanol em 100mM de tampão citrato de sódio pH5.6)

3.2 OBTENÇÃO DOS MODELOS CRISTALOGRAFICOS

3.2.1 Processamento dos dados de difração de raios-X, refinamento e validação dos modelos cristalográficos.

Após o processo de refinamento dos modelos cristalográficos foi possível obter seis estruturas, duas da smUPb (smUPb_{apo} e smUPb+citrato) e cinco da smUPa (smUPa_{apo}, smUPa+uracil, smUPa+timina, smUPa+timidina e smUPa+5-

fluorouracil). Não foi possível obter um conjunto de dados satisfatório a partir dos cristais oriundos da co-cristalização com uridina das isoformas obtidas.

As estruturas da smUPa+Timidina, smUPaapo, smUPa+uracil, smUPa+Timina, smUPa+5fluorouracil e SmUPbapo do sistema cristalino ortorrômbico com o grupo espacial $P2_12_12_1$ difrataram até 1.66 Å, 1.89 Å, 1.92 Å, 1.93 Å, 2.07 Å e 2.02 Å de resolução, respectivamente. O cristal da smUPb+citrato do sistema cristalino trigonal com grupo espacial $P3_12$ difratou até 1.98Å. Após o processamento dos dados (**Tabela 1 e 2**), a realização da estimativa do conteúdo da unidade assimétrica via coeficiente de Mathews permite concluir que todas as estruturas obtidas possuem quatro moléculas na unidade assimétrica, exceto a smUPa+timina e smUPbapo que apresentam apenas duas, (**Tabela 3 e 4**). Uma vez obtida a primeira estrutura de smUP, no caso a smUPb-citrato, esta foi usado na substituição molecular das demais estruturas obtidas. As validações estereoquímicas (via *Molprobability*) e de compatibilidade do modelo com os dados de difração observados (R_{work} e R_{free}) permitem concluir que as estruturas apresentadas neste trabalho são aceitáveis como representantes das estruturas proteica que formam os cristais obtidos (**Tabela 5 e 6**). Os modelos finais das smUPs contem entre 276-290 aminoácidos modelados para cada cadeia presente na unidade assimétrica (UA), com massa molecular de ~32.61kDa por monômero. De modo geral, em todas as estruturas da smUPa não foi possível modelar em pelo menos uma das cadeias presentes na UA resíduos 64-65 (**Tabela 7**). As regiões entre o 175 e o 181 não foi possível modelar somente na cadeia A da smUPa-Uracil. Somente na smUPbapo não foi possível modelar a região entre os resíduos 179-184 e entre 264-271 em todas as cadeias (**Tabela 8**) devido à ausência de densidade eletrônica interpretável. As smUPs se apresentam como homodímeros, normalmente dois por UA, com exceção do modelo smUPa+Timina e smUPbapo que apresenta apenas um dímero por UA. A porcentagem de solvente nos cristais, estimada via coeficiente de Matthews, e as análises de estabilidade do complexo em solução, realizadas via PISA (**Tabela 9**), permitem assegurar que o homodímero apresentado na UA representa a estrutura do complexo em solução. Existe uma grande área de interface entre os monómeros que compõem um homodímero e esta é composta essencialmente de Contatos de Van der Waals (VDW) e ligações de hidrogênio distribuídos em ~55 resíduos

de cada monômero (**Tabela 10**). Existe uma pequena área de interface de contato entre homodímeros composta por poucos resíduos, certamente resultado do empacotamento cristalino.

Tabela 1 - Estatísticas da coleta e processamento dos conjuntos de dados utilizados para obter as estruturas da smUPa.

	SmUPa + Timidina	SmUPaapo	smUPa + Uracil	smUPa + Timina	smUPa + 5FU
Detector	Quantum 315A	Quantum 315A	Quantum 315A	PILATUS 2M	R-Axis IV++
Parâmetros da cela (Å)	95.82 108.82 116.06	96.07 109.03 119.04	95.85 108.53 118.67	79.36 84.87 87.42	95.64 107.49 115.58
Resolução (Å) ^d	79.09 - 1.66 (1.70- 1.66)	61.63-1.89 (1.94-1.8)	74.57 - 1.92 (1.97 – 1.92)	48.3 – 1.93 (2.04 - 1.93)	30.00 - 2.07 (2.12 - 2.07)
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Fonte de raios-X	Diamond-I04	Diamond-I04	Diamond-I04	Diamond-I04	MicroMDX-007HF
λ(Å)	0.961	0.961	0.961	0.92	1.54
Multiplicidade	4.5 (4.6)	5.5 (5.5)	3.9 (3.9)	4.7 (4.4)	3.8 (3.6)
R _{meas} (%) ^a	10.7 (67.4)	6.6 (55.6)	10.4 (71.0)	11.9 (66.5)	11.4 (63.0)
Completeza (%)	96.0 (90.4)	100.0 (100.0)	99.7 (100.00)	97.1 (88.8)	98.6 (94.4)
Número de reflexões	338455 (46298)	255552 (36586)	94628 (27389)	209662 (28218)	306780 (44454)
Número de reflexões únicas	74612 (10159)	46609 (6695)	94628 (9359)	43916 (6396)	80105 (12909)
I/σ *	9.7 (2.4)	10.4 (2.9)	10.5 (2.31)	10.1 (2.4)	11.61 (2.41)

a $R_{meas} = \sum h (n_h/n_h - 1)^{1/2} \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum h \sum_i I_i(h)$, onde $I_i(h)$ e $\langle I(h) \rangle$ são inésimos da intensidade média e n_h é a multiplicidade de todas as reflexões h com simetrias equivalentes.

b $R_{sym} = \sum h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum h \sum_i I_i(h)$, onde $I_i(h)$ e $\langle I(h) \rangle$ são os inésimos da intensidade média de todas as reflexões h com simetrias equivalentes (45).

c $R = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ onde $|F_c|$ é a amplitude do fator de estrutura calculado a partir do modelo e $|F_o|$ é a amplitude do fator de estrutura observado. O R_{free} é calculado com base em 5% do conjunto de reflexões que não é utilizado durante o refinamento.

d Valores entre parênteses referem-se aos valores da mais alta resolução.

Tabela 2 - Estatísticas da coleta e processamento dos conjuntos de dados utilizados para obter as estruturas da smUPb.

	smUPb _{apo}	smUPb + Citrato
Detector	R-AXIS IV++	marmosaic 225
Parametros da cela (Å)	57.70	112.53
<i>a, b, c</i>	76.28	112.53
	118.96	152.35
Resolução (Å) ^d	19.82 - 2.02 (2.14 – 2.02)	33.16 – 1.98 (2.09 – 1.98)
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P3 ₁ 2
Fonte de raios-X	MicoMDX-007HF	LNLS-MX2
λ (Å)	1.54	1.45
Multiplicidade	3.5 (2.7)	5.2 (4.9)
R _{meas} (%) ^a	9.2 (36.9)	9.9 (59.2)
R _{sym} (%) ^b	--	9.0 (53.2)
Completeza (%)	93.0 (81.4)	99.1 (96.9)
Número de reflexões	114824 (12360)	384708 (51578)
Número de reflexões únicas	32883 (4546)	74574 (6929)
I/ σ *	10.07 (2.65)	9.74 (2.16)

a $R_{meas} = \sum h [nh/(nh - 1)]^{1/2} \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum h \sum_i I_i(h)$, onde $I_i(h)$ e $\langle I(h) \rangle$ são o inésimos da intensidade média e nh é a multiplicidade de todas as reflexões h com simetrias equivalentes.

b $R_{sym} = \sum h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum h \sum_i I_i(h)$, onde $I_i(h)$ e $\langle I(h) \rangle$ são os inésimos da intensidade média de todas as reflexões h com simetrias equivalentes (45).

c $R = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ onde $|F_c|$ é a amplitude do fator de estrutura calculado a partir do modelo e $|F_o|$ é a amplitude do fator de estrutura observado. O R_{free} é calculado com base em 5% do conjunto de reflexões que não é utilizado durante o refinamento.

d Valores entre parênteses referem-se aos valores da mais alta resolução.

Tabela 3 – Estimativa do conteúdo da unidade assimétrica das estruturas obtidas da smUPa.

	smUPa + Timidina	smUPaapo	smUPa + uracil	smUPa + Timina	smUPa + 5- fluorouracil
Número de mol/UA	4	4	4	2	4
Coeficiente Matthews	2,30	2,39	2,37	2,26	2,39
% solvente	46,64	48,56	48,05	45,54	48,51
Probabilidade	0,70	0,67	0,68	0,99	0,67

Tabela 4 – Estimativa do conteúdo da unidade assimétrica das estruturas obtidas da smUPb

	smUPbapo	smUPb-citrato
Número de mol/UA	2	4
Coeficiente Matthews	2,01	2,13
% solvente	38,75	42,42
Probabilidade	0,91	0,60

Tabela 5 - Validação dos modelos obtidos por difração de raio-X da smUPa

	smUPa + timidina	smUPaapo	smUPa + uracil	smUPa + timina	smUPa + 5-fluorouracil	Ref
Rwork	0,16	0.21	0,18	0,19	0,16	
Rfree	0,20	0.25	0,22	0,24	0,20	
Clashscore	3.21 (98th)	4.81 (97th)	4.27 (98th)	14.18 (58th)	2,74	*
Rotâmeros incomuns	0,72%	2.5%	0,16%	1.36%	0,78%	<1%
Ramachandran região não permitida	0	0.18%	0	0	0	<0.05%
Ramachandran região favorecida	97,11%	96%	97,61%	97.48%	97,91%	>98%
Molprobiy score	1.27 (97th)	1.81 (81st)	1.44 (97th)	1.86 (79th)	1.08 (100th)	**
Ligações problemáticas do <i>backbone</i>	0	0	0	0	0	0
Ângulos do <i>backbone</i> não usuais	0,2	0	0,2	0	0	<0.1%

* 100th é a melhor entre estruturas de resolução comparável; 0th é a pior.

** O *MolProbiy* score combina os valores de *clashcore*, qualidade dos rotâmeros e ramachandra em um único sistema de pontuação normalizado para a mesma escala de resolução.

Tabela 6 - Validação dos modelos obtidos por difração de raios-X da smUPb

	smUPbapo	smUPb+citrato	Referência
R _{work}	0,18	0.16	
R _{free}	0,22	0.20	
<i>Clashscore</i>	5.18 (97th)	3.5 (99th)	*
Rotâmeros incomuns	2,04%	3.05%	<1%
Ramachandran não permitidos	0	0.24%	<0.05%
Ramachandran favorecidos	99,27%	97.85%	>98%
MolProbiy score	1.51 (97th)	1.54 (96th)	**
Ligações problemáticas do backbone	0	0.06%	0
Ângulos do backbone não usuais	0	0.05%	<0.1%

* 100th é a melhor entre estruturas de resolução comparável; 0th é a pior.

** O *MolProbity* score combina os valores de *clashcore*, qualidade dos rotâmeros e ramachandra em um único sistema de pontuação normalizado para a mesma escala de resolução.

Tabela 7 – Número de moléculas de água e resíduos modelados e loops não modelados da smUPa

	smUPa + timidina	smUPaapo	smUPa + uracil	smUPa + Timina	smUPa + 5-fluorouracil
Moléculas de água	1517	628	1175	527	1249
Resíduos modelados	290 (A)	289 (A)	282 (A)		287 (A)
	291 (B)	290 (B)	285 (B)	286 (A)	286 (B)
	284 (C)	286 (C)	290 (C)	283 (B)	290 (C)
	290 (D)	280 (D)	289 (D)		290 (D)
Regiões não modeladas	177-181 (C)	64,65 (C) 64,65 (D)	64,65 (A) 175-181 (A)	64-66 (A) 64-67 (B)	65,66 (A) 65,66 (B)
	64,65 (C)	180-182 (D)	180,181 (B)		

Tabela 8 – Número de moléculas de água e resíduos modelados e loops não modelados da smUPb.

	smUPbapo	smUPb+citrato
Moléculas de água	305	738
Resíduos modelados		290 (A)
	285 (A)	287 (B)
	276 (B)	279 (C)
Loops não modelados	182-185 (A)	264-269 (B)
	264-267 (A)	263-266 (C)
	179-184 (B)	12-17 (C)
	264-271 (B)	

Tabela 9 - Estimativa da estabilidade em solução dos estados oligoméricos observados nos modelos cristalográficos realizada pelo PISA. Calculados a partir da smUPa-timidina, que apresentou essencialmente os mesmos valores das demais estruturas da smUPa e smUPb. AB e CD fazem referência aos dois dímeros da UA.

	ASA ¹	BSA ²	ΔG diss ³
AB	2203,1	5561,6	34,1
CD	2052,6	5538,6	32,6

¹ ASA: Área de superfície acessível (Å²);

² BSA: Área de superfície enterrada (Å²);

³ ΔG diss: barreira de dissociação (kcal/mol).

Tabela 10 - Análise das regiões de interface entre as cadeias presentes na unidade assimétrica dos modelos cristalográficos. Tabela gerada baseada na estrutura da smUPa-timidina.

Interface	Nº resíduos	Área de interface (Å ²)	Nº Ligação de Hidrogênio	Nº Contatos VDW
AB	55 – 55	2756 – 2747	31	322
CD	53 – 55	2797 – 2762	32	315
AD	2 – 3	127 – 109	1	4
BD	2 – 3	103 – 84	-	8

3.2.2 Mapa difuso no dímero CD o da smUPaapo

O dímero CD da estrutura da smUPaapo apresentou o mapa de densidade eletrônica mal definido, difuso e de difícil interpretação (Figura 15). Uma das causas desse problema poderia ser a utilização de um grupo espacial errado, no entanto, o reprocessamento do conjunto de dados utilizando outros grupos espaciais viáveis implicavam em um empacotamento cristalográfico com graves choques estéricos. É possível que essa característica deste mapa de densidade eletrônica seja resultado da movimentação de um dímero em relação ao outro, o que está de acordo com o B-fator das cadeias que sugere uma mobilidade maior do dímero CD (Figura 16). A determinação dos grupos TLS realizada durante o refinamento identificou ao todo 21 grupos, 9 da cadeia A, 5 da cadeia B, 4 da cadeia C e 2 da cadeia D (Tabela 11). As cadeias C e D são divididas em menos grupos e, naturalmente, estes com número maiores de resíduos, em relação as cadeias A e B. Esse fato sugere os segmentos da cadeia C e D se deslocam mais uniformemente, especialmente a cadeia D, que deve se comportar praticamente como um único corpo rígido na estrutura cristalográfica. Neste caso, somente o homodímero AB, cujo o mapa de densidade eletrônica apresentou-se bem definido, foi utilizado para fundamentar todas as conclusões e hipóteses deste trabalho.

Figura 15 – Mapas de densidade eletrônica ($2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$; $\sigma=1.0$) de regiões equivalentes no dímeros diferentes da smUPaapo. A) smUPaapo cadeia A; B) smUPaapo cadeia D.

Figura 16 - Representação do B-fator em função do *backbone* da smUPaapo das cadeias presentes na UA. A cor do *backbone* varia em um gradiente de que vai do azul (B-fator=10), passando pelo branco (valores intermediários), até o vermelho (B-fator>100) e a largura do *backbone* é proporcional a estes valores. Os valores maiores de B-fator são das cadeias C e D, o que sugere que o dímero CD, que apresenta uma ampla região do mapa de densidade eletrônica de difícil interpretação, pode apresentar uma movimentação em relação ao outro dímero da UA.

3.3 smUPa

Para facilitar a descrição das demais estruturas e discussão, descreveremos a estrutura da smUPa+timidina com o intuito de apresentar as características gerais e, naturalmente, comuns nas demais estruturas da smUPa e smUPb obtidas. Em seguida descreveremos as demais estruturas com ênfase nas diferenças em relação à smUPa+timidina

O homodímero da smUPa, assim como das demais estruturas obtidas, é composto por dois monômeros relacionadas por um eixo de simetria de ordem 2 (**Figura 17**) e com uma ampla área de interface entre os monômeros, formada principalmente por contatos Van der Waals (VDW) e algumas ligações de hidrogênio entre aproximadamente 53 resíduos de cada monômero (**Tabela 9** e **Tabela 10**). Esta ampla área de interface entre os monômeros torna o dímero muito estável em solução e a promoção da sua dissolução deverá exigir o dispêndio de muita energia. Não há pontes salinas ou ligações dissulfeto formadas nas interfaces entre as cadeias. A interface de contato entre homodímeros diferentes é artefatos do empacotamento cristalino. A smUPa+timidina apresenta como UA dois homodímeros, cada monômero, cadeias A, B, C e D são formadas por 290, 290, 284 e 290 aminoácidos, respectivamente, com massa molecular de ~32.61kDa. O monômero da smUPa (**Figura 18**) é composta por duas folhas β (8 fitas compondo a folha A e 2 fitas, a folha B) e 10 hélices (nove α -hélices e uma hélice 3_{10}), duas voltas- δ (entre $\beta 2$ e $\beta 3$ - resíduos 84,85- e entre H8 e $\beta 10$ - resíduos 246-247), uma volta- γ (entre $\beta 6$ e $\beta 7$ - resíduos 154-156), cinco longos (>10 resíduos) loops conectivos (H1:H2; H3: $\beta 2$; $\beta 5$: $\beta 6$; $\beta 8$:H7; $\beta 10$:H9) e 5 menores (>5 e <10 resíduos). Parte da folha- β A forma um barril- β distorcido composto por cinco fitas- β ($\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 9$, $\beta 10$). A folha- β B é formada por um grampo de cabelo entre $\beta 6$ e $\beta 7$.

Figura 17 - Homodímero da smUPa (os monômeros se relacionam por um eixo de simetria de ordem dois). Figura baseada no dímero AB da smUPa+Timidina.

Figura 18 – Elementos de estrutura secundária do monômero e nomenclatura adotada para se referir a estes elementos da smUPa+timidina. H = Hélices; β =fitas β ; L= loops conectivos.

3.3.1 Sítio Ativo da smUPa+timidina

Cada homodímero presentes na UA da estrutura smUPa+timidina comporta dois sítios ativos, e cada um contém dois sítios de ligação (um ao fosfato e outro ao nucleosídeo). Em cada um dos sítios ativos foi possível identificar uma molécula de Timidina, ocupando o sítio de ligação ao nucleosídeo, e outra de SO_4 , ocupando o sítio de ligação ao fosfato, com densidade eletrônica bem definida (**Figura 19**). A região do sítio ativo é formada por resíduos de ambas as subunidades que compõem o homodímero.

Figura 19 – Presença de duas moléculas de Timidina e Sulfato no homodímero da smUPa+timidina. A) Região de ligação ao substrato da smUPa+timidina (destaque círculos vermelhos) B) Mapa de densidade eletrônica ($2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$; $\sigma=1.0$) da região onde encontrasse a timidina e o sulfato.

3.3.1.1 Sítio de ligação ao nucleosídeo

O sítio de ligação ao nucleosídeo do homodímero composto pelas cadeias A e B é formado pelos resíduos His22(B), Arg77(B), Met93(A), Thr124(A), Ser125(A), Gly126(A), Phe197(A), Gln201(A), Arg203(A), Met231(A), Glu232(A),

Met233(A), Glu234(A), Arg259(A) e Ala256(A). O segundo sítio deste homodímero é simétrico em relação ao primeiro, isto é, formado predominantemente pelos resíduos correspondentes à cadeia B.

A interação direta entre o sítio e o nucleosídeo é realizada pelos resíduos Q201(A), R203(A), T124(A) e H22(B). A interação por ligação de hidrogênio com a base nitrogenada é mediada pelos resíduos Q201 e R203, que se localizam logo após uma hélice 3_{10} presente no loop L8, que conecta $\beta 8$ e H7, além de uma molécula de água presente no sítio que é capaz de formar uma ligação de hidrogênio com o O(2) (**Figura 20**). Q201 e R203 são aminoácidos conservados entre as UPs conhecidas⁹⁰ e são resíduos chaves para o reconhecimento da base nitrogenada do nucleotídeo, uma vez que conferem ao sítio a capacidade de formar pontes de hidrogênio com o O(2), N(3) e O(4) da base pirimídica. Essa capacidade restringe a liberdade de conformações que podem ser acomodadas no sítio de acordo com a posição desses átomos e desses resíduos. Uma única molécula de água faz contato direto com a base, esta molécula também é capaz de formar ligações de hidrogênio com Q201 e R259. O R259 forma uma ligação de hidrogênio com o oxigênio da cadeia principal da Q201, o que certamente diminui a liberdade de variação dos ângulos phi-psi deste resíduo (**Figura 21**).

Existem três ligações de hidrogênio entre resíduos da enzima e a ribose: um envolvendo resíduos da cadeia B (H22(B):O(5)) e dois resíduos envolvendo da cadeia A (E234(A):O(3) e T124:A:O(4)). Uma molécula de água, que tem sua posição coordenada por H21(B) R77(B) e T124(A), também forma ligações de hidrogênio com O₅ e O₄ da ribose (**Figura 22**). Porém, a maior parte dos resíduos fazem contatos de VdW com o nucleosídeo que delimitam a cavidade presente no sítio e, conseqüentemente, restringem a orientação da base em relação a ribose (**Figura 23**).

Figura 20 – Ligações de hidrogênio formadas com a base nitrogenada da timidina e o sítio ativo. Os resíduos Q201 forma ligações de hidrogênio com o O(2) e N(3), enquanto o R203 e uma molécula de água são capazes de formar com o O(4). Distância das ligações de hidrogênio em Å. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$; $\sigma=1.0$.

Figura 21 – Rede de ligação de hidrogênio envolvendo Q201, R259 e uma molécula de água. A ligação de hidrogênio entre o R259 e o oxigênio da cadeia principal do Q201 certamente restringe a liberdade de variação dos ângulo phi e psi deste resíduo. Distância das ligações de hidrogênio em Å. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$; $\sigma=1.0$.

Figura 22 – Ligações de hidrogênio formadas com a ribose da timidina e o sítio ativo da smUPa+timidina. Existem três ligações de hidrogênio entre resíduos da enzima e a ribose: um envolvendo resíduos da cadeia (H22(B):O₅) e dois resíduos envolvendo da cadeia A (E234(A):O₃ e T124:A:O₄). Uma molécula de água, que tem sua posição coordenada por H21(B) R77(B) e T124(A) forma ligações de hidrogênio com O₅ e O₄ da ribose. Distância das ligações de hidrogênio em Å, Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$; $\sigma=1.0$..

Figura 23 – Resíduos do sítio ativo da smUPa+timidina que fazem contatos de Van der Waals com o nucleosídeo. Superfície representando a superfície dos átomos dos resíduos que compõem a cavidade do sítio ativo.

3.3.1.2 Sítio de ligação ao fosfato

O sulfato pode ser considerado como um análogo do fosfato, pois, devido a características químicas semelhantes, normalmente este é capaz de se ligar ao sítio do fosfato. Desse modo, a utilização do íon sulfato para identificar características e extrair conclusões sobre o sítio de ligação ao fosfato de uma enzima é viável. O sítio do fosfato da smUPa é formado pelos resíduos Cys45(A), Gly46(A), Arg50(B), Arg77(B), Glu123(A), Thr124(A) e Arg121(A). O SO_4^{2-} tem sua carga formal neutralizada por três argininas - Arg50(A), Arg77(A) e Arg121(A) que junto com uma treonina, Thr124(A), são os resíduos responsáveis pela ligação ao fosfato e são conservados entre as demais UPs conhecidas⁹⁰ (**Figura 24**). Os resíduos Cys45(A) e Glu123(A) não formam ligações de hidrogênio com o sulfato, mas se encontram próximos o suficiente do O(2), 3.6Å e 3.5Å, respectivamente, para formar contatos do tipo Van der Waals. A R50(A) apresenta conformação dupla: a conformação A na qual a R50(A) forma duas ligações de hidrogênio com o sulfato, além de ser possível formar também com uma molécula de água coordenada por ligações de hidrogênio entre oxigênios da cadeia principal dos resíduos L122(A) e A276(A); a conformação B, na qual a cadeia é assume direção oposta ao sulfato e possibilita a formação de uma ligação de hidrogênio com a T273(A) e uma molécula de água (**Figura 25**).

Figura 24 - Ligações de hidrogênio formadas entre o fosfato e resíduos do sítio ativo da smUPa+timidina. Os resíduos que formam ligações de hidrogênio com o sulfato são o R50(A)(com o O4), R77(B)(com o O3 e O4), R121(A) (com o O2 e O1) e T124(A) (com o O1). Os resíduos C45(A) e G123(A) não formam ligações de hidrogênio com o sulfato, mas fazem contatos do tipo Van der Waals com o O2 do sulfato. Distâncias expressas em Å, Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$; $\sigma=1.0$..

Figura 25 – Conformações dupla do R50 da cadeia A da smUPa+timidina. A conformação A é capaz de formar duas ligações de hidrogênio com o sulfato (O4 e O2). Além de poder formar uma ligação de hidrogênio com uma molécula de água, coordenada pelo resíduos A276 e L122. A conformação B é capaz de formar ligações de hidrogênio com o resíduo T273 e uma molécula de água. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$; $\sigma=1.0$.

3.3.2 Loop 17

Apesar de não fazer contato direto com o substrato, o *loop* 17 (L17), compostos pelos resíduos do trecho T255-T269 e conecta β 10 com H9, pelo seu posicionamento em relação ao sítio ativo (**Figura 26**), pode ser considerado análogo ao L9 da UP de *Salmonella typhimurium* (stUP), um loop característico de UPs, que tem influência sobre a mecânica de ligação ao substrato e exposição do sítio ativo ao solvente⁹⁰. O L9 normalmente apresenta alta mobilidade e a conformação apresentada nos modelos cristalográficos normalmente possui correlação com o estado funcional do sítio (fechada, intermediária ou aberta dependendo do estado ocupado ou não do sítio). Sua variação de conformação as vezes pode envolver o desenovelamento de trechos de hélices adjacentes e a sua conformação certamente influencia a acessibilidade do solvente ao sítio ativo⁹⁰. Para facilitar a discussão iremos dividir o L17 em três regiões (**Figura 26**): região A, que compreende os resíduos do trecho T255-N258 e faz contato com o loop L8 (resíduos G127-G133) que conecta a β 4 e β 5; região B, que compreende os resíduos do trecho E259-D263 e contém resíduos que fazem contato com o L13 do monômero adjacente (A193-K213) que conecta β 8 e H7; região C, que compreende os resíduos do trecho Q264-T269 e contém resíduos que interagem com o L1, composto pelos resíduos do monômero adjacente (E14-D31) que conecta H1 e H2.

Figura 26 – Divisão do L17 da smUPa+timidina em três regiões e os loops onde ocorre contato da smUPa+timidina. A) Representação em *cartoon* do L17 e suas regiões A (Laranja), B(Azul) e C(Ciano). B) Superfície do Dímero AB da smUPa+timidina, destacando a região respectiva a cada região do L17.

O L17 na estrutura da smUPa+timidina apresentou uma conformação equivalente à caracterizada como “fechada”, que bloqueia o acesso do solvente ao sítio ativo. Os resíduos do trecho A do L17 formam quatro ligações de hidrogênio, todas envolvendo somente átomos do *backbone* do L8. Destas quatro ligações, somente duas envolvem átomos da cadeia lateral de resíduos do L17 (T255 e N258) (**Figura 27**). A maior parte do potencial de formação de ligação de hidrogênio é formada com moléculas de água, devido a exposição na superfície da enzima.

Figura 27 – Ligações de hidrogênio entre a região A do L17(A) (Laranja) com o L8(A) (azul) e moléculas de água (esferas vermelhas). Distância entre átomos envolvidos em ligações de hidrogênio expressas em Ångstroms. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$; $\sigma=1.0$

Na região B, o resíduo K216 auxilia a manutenção da conformação desse trecho do L17 graças a ligações de hidrogênio com O_R259, O_G262 e Oδ1_D263. Outras ligações são formadas entre os resíduos do L17, Nε_R259:O_G262, N_E261:O_N258 e N_L260:Oδ1_N258. Esta região é exposta

parcialmente ao solvente, de modo que duas moléculas de água fazem ligações de hidrogênio com dois átomos expostos ao solvente O_L260 e N_D263 (**Figura 28**). Apesar de não interagir diretamente com a timidina, o R259 forma uma ligação de hidrogênio com uma molécula de água que interage com a Timidina e o resíduo Q201 (importante para o reconhecimento da base nitrogenada). Outro resíduo que interage diretamente com a timidina, o R203, interage com o L17 via a ligação de hidrogênio entre o N ϵ _R203:O_D263. Existe ainda outro contato entre o L17 e o L13 mediado pela ligação de hidrogênio O δ _D263:N_L204 (**Figura 29**). A interação entre esses loops, especialmente que ocorre com o Q201 e o R203, favorece a manutenção das conformações que permitem a interação com o substrato.

Figura 28 – Ligações de hidrogênio entre os resíduos da região B do L17 e a K216, N358 e moléculas de água (esfera vermelha). Distância entre átomos envolvidos em ligações de hidrogênio expressas em Angstrons. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$; $\sigma=1.0$

Figura 29 - Interação entre os resíduos R259 e D263 do L17 da smUPa+timidina com resíduos (Q201 e R203) e uma molécula de água (esfera vermelha) envolvidos na ligação a timidina. Distância entre átomos envolvidos em ligações de hidrogênio expressas em Ångstroms. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$; $\sigma=1.0$

Figura 30 – Ligação de hidrogênio entre o Q264 da região C do L17 da smUPa+timidina com o D205, D18, V19 e duas moléculas de água. Distância entre átomos envolvidos em ligações de hidrogênio expressas em Ångstroms. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$; $\sigma=1.0$

Figura 31 – Ligações de hidrogênio entre os resíduos da região C do L17 da smUPa+timidina com moléculas de água (esferas vermelhas). Distância entre átomos envolvidos em ligações de hidrogênio expressas em Angstroms. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$; $\sigma=1.0$

O trecho C medeia a única interação direta do L17 com o L1 mediada pelo Q264 (com o D18 e V19). O Q264 é capaz de formar cinco ligações de hidrogênio que se distribuem entre o resíduos D18 ($N_{\epsilon_Q264}:O_{\gamma_D18}$), V19 ($O_{\delta_Q264}:N_{\gamma_V19}$), D205 do L13 e duas moléculas de água (**Figura 30**). Este trecho é o mais exposto ao solvente e todo o loop com exceção do Q264 e interage apenas com moléculas de água (**Figura 31**).

O L17 por seu posicionamento apresentado na smUPa+timidina próximo ao sítio bloqueia o acesso deste ao solvente, especialmente via as regiões B e C. Como não há outra via de acesso ao sítio, a ligação da timidina ao sítio necessariamente exige que o L17 assuma alguma outra conformação.

3.4 smUPaapo

A smUPaapo apresenta 2 moléculas na UA, com grupo espacial $P2_12_12_1$ e essencialmente as mesmas características da smUPa+timidina em termos de

composição e posição de elementos de estrutura secundária (**Figura 32**). A sobreposição das duas estruturas apresenta RMSD entre os C α de 0,17 Å e os resíduos do sítio de ligação ao nucleosídeo da smUPaapo apresentam as mesmas conformações do smUPa+timidina (**Figura 33**). O mesmo acontece com os resíduos do sítio de ligação ao fosfato (RMSD de 0.15Å) (**Figura 34**). Um dos sítios, entre os quatro presente na unidade assimétrica da smUPaapo apresentou uma molécula de sulfato, provavelmente oriundo do processo de expressão e purificação, com as mesmas características presentes no sítio de ligação fosfato da smUPa+timidina. Portanto, a estrutura da smUPaapo apresenta essencialmente as mesmas características estruturais da smUPa+timidina. A presença da timidina não parece requerer grandes mudanças no posicionamento do L17, L8 e L1. O L17 apresentou-se com a mesma conformação “fechada” na smUPaapo (RMSD de 0.15 Å) (**Figura 35**), apesar da ausência de ligantes.

Figura 32 – Sobreposição do dímero AB das estruturas da smUPaapo e smUPa+timidina.

Figura 33 – Sobreposição dos resíduos que compõem o sítio ativo da *smUPaapo* e *smUPa+timidina*. O mapa de densidade eletrônica apresentado é referente aos resíduos da *smUPaapo*. Os resíduos da *smUPa+timidina* são apresentados em azul (com transparência). Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ da *smUPaapo*; $\sigma=1.0$

Figura 34 – Sobreposição dos resíduos que compõem o sítio de ligação ao fosfato da *smUPaapo* e *smUPa+timidina*. O mapa de densidade eletrônica apresentado é referente aos resíduos da *smUPaapo*. Os resíduos da *smUPa+timidina* são apresentados em azul (com transparência). Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ da *smUPaapo*; $\sigma=1.0$

Figura 35 – Sobreposição dos resíduos que compõem o loop L17 da *smUPaapo* e *smUPa+timidina*. O mapa de densidade eletrônica apresentado é referente aos resíduos da *smUPaapo*. Os resíduos da *smUPa+timidina* são apresentados em azul (com transparência). Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ da *smUPaapo*; $\sigma=1.0$

3.5 SmUPa Uracil, Timina e 5-fluorouracil

Estruturas da *smUPa* com uracil, timina e 5-fluorouracil foram obtidas. Todos esses ligantes são bases nitrogenadas e a principal diferença com a timidina está na ausência da ribose. Todas as estruturas apresentaram sulfato na mesma região da *smUPa+timidina*, isto é, no sítio de ligação ao fosfato.

A sobreposição da *smUPa+timidina* com as estruturas da *smUPa+uracil*, *smUPa+timina* e *smUPa+5-fluorouracil* permite concluir que, assim como na *smUPaapo*, praticamente não há diferenças significativas na posição dos elementos de estrutura secundária devido a interação com esses diferentes

ligantes (**Figura 36**). A única região que não foi possível determinar a conformação foi a região inicial (resíduos L64, A65 e L66) do loop L4, que conecta o H3 e β 2, e contém o R77 (que contribui com a ligação ao sulfato e, indiretamente, com a ligação a ribose) nas estruturas da smUPa+uracil, smUPa+timina e smUPa+5-fluorouracil (Figura 36 D), possivelmente devido a maior flexibilidade dessa região. No entanto, nem todas as cadeias presentes na UA dessas estruturas apresentaram conformação não definida, na verdade somente a cadeia A da smUPa+uracil, as cadeias A e B da smUPa+timina e da smUPa+5fluorouracil não foi possível determinar a conformação deste loop. A maior flexibilidade aparenta ser uma característica intrínseca da estrutura, pois nas cadeias em que foi possível determinar a conformação deste loop havia contato com cadeias de UAs adjacente. A cadeia C da smUPa+timidina foi a única cadeia dessa estrutura que não foi possível determinar a conformação do L4, o único que não forma nenhum contato com cadeias de UA adjacentes. Desse modo, a menor flexibilidade do L4 observado na estrutura é resultado do empacotamento cristalino.

A interação da 5-fluorouracil (**Figura 37**), uracil (**Figura 38**) e timina (**Figura 39**) com o sítio ativo apresenta as mesmas características, mediada pelos mesmos resíduos (Q201 e R203) com as mesmas conformações, da interação smUPa com a timidina. Os oxigênios da ribose são substituídos por moléculas de água e os componentes do sítio ativo que interagem com a ribose (isto é, H22(B), E234(A) e uma molécula de água) formam ligações de hidrogênio com essas moléculas. A reversibilidade da reação catalisada pelas UPs exige da estrutura a capacidade de tratar produtos como reagentes, e vice-versa, em determinadas situações, o que justifica a interação com bases nitrogenadas (como uracil e timina) forte o suficiente para permitir a identificação nas estruturas cristalográficas.

A região de ligação ao sulfato nas estruturas smUPa+timina e smUPa+uracil apresentou as mesmas características observadas na estrutura da smUPa+timidina. A estrutura da smUPa+5-fluorouracil também apresentou praticamente as mesmas características da estrutura smUPa+timidina, com exceção do R50 que não possui a conformação dupla. A R50 do sítio de ligação ao fosfato forma uma ligação de hidrogênio formada entre o sulfato, presente nas

demais estruturas da smUPa, e esse papel é realizado por uma molécula de água no sítio da smUPa+5-fluorouracil. Aparentemente, não há nenhuma relação óbvia entre a presença do flúor com a ausência da dupla conformação do R50.

Figura 36 – Sobreposição das estruturas da smUPa-timidina com a (A) smUPa+5-fluorouracil, (B) smUPa+timina e (C) smUPa+uracil e região inicial do L4 ausente nas estruturas com da smUPa com 5-fluorouracil, uracil e timina.

Figura 37 – Interação entre os resíduos do sítio ativo da smUPa e 5-fluorouracil. Moléculas de água representadas pelas esferas vermelhas. Distância entre átomos envolvidos em ligações de hidrogênio expressas em Angstroms. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ da smUPa+5-fluorouracil; $\sigma=1.0$

Figura 38 - Interação entre os resíduos do sitio ativo da smUPa e uracil. Moléculas de água representadas pelas esferas vermelhas. Distância entre átomos envolvidos em ligações de hidrogênio expressas em Angstroms. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ da smUPa+uracil; $\sigma=1.0$

Figura 39 - Interação entre os resíduos do sitio ativo da smUPa e timina. Moléculas de água representadas pelas esferas vermelhas. Distância entre átomos envolvidos em ligações de hidrogênio expressas em Angstroms. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ da smUPa+Timina; $\sigma=1.0$

As estruturas da smUPa interagindo com Timina, Uracil e Timidina sugerem que a smUPa pode ser capaz de catalisar a fosforólise reversível da Timidina e Uridina, uma característica comum das demais UPs de outros organismos conhecidas. A 5-Fluorouracil é comumente utilizada no tratamento de vários tipos de câncer que, por ser um antimetabólito da uracil, tem sua eficiência terapêutica fortemente influenciada pela hUP. A estrutura da smUPa+5-fluorouracil sugere que esta enzima tem a capacidade de interagir com esta droga. Todas as estruturas reforçam o papel dos resíduos Q201 e R203 no reconhecimento de anéis pirimídicos.

Figura 40 – Sítio de ligação ao fosfato da estrutura da smUPa+5-fluorouracil. Destaque para ausência de conformação dupla da R50(A), característica presente em todas as estruturas obtidas da smUPa obtidas. Moléculas de água representadas pelas esferas vermelhas. Distância entre átomos envolvidos em ligações de hidrogênio expressas em Angstroms. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ da smUPa+5-fluorouracil; $\sigma=1.0$

3.6 smUPb

A smUPb é uma segunda isoforma da UP presente no *Schistosoma mansoni* e compartilha 92% de identidade com a smUPa. Duas estruturas da smUPb foram obtidas, uma sem ligantes (a smUPbapo) e uma interagindo com citrato (a smUPb-citrato). Naturalmente, a smUPb apresentou enovelamento semelhante ao da smUPa, de modo que o mesmo sistema de nomenclatura de estruturas secundária será utilizado para descrever a smUPb. Para facilitar a discussão sobre diferenças entre a smUPa e smUPb, adotaremos a seguinte notação para se referir a divergência a nível de estrutura primária: resíduo da smUPa seguido de sua posição e do resíduo da smUPb correspondente, por exemplo, G126D se refere ao 126G na smUPa e 126D na smUPb.

3.7 smUPbapo

A estrutura smUPbapo apresenta essencialmente o mesmo enovelamento da smUPaapo. Na estrutura da smUPbapo não foi possível determinar a conformação de dois *loops*, o L12 e o início do L17 (**Figura 41**), o que não ocorre na estrutura da smUPaapo. O que sugere que estes *loops* apresentam uma maior flexibilidade na smUPb em relação a smUPa. A maior flexibilidade também se reflete na hélice H8, que apresenta um pequeno desvio quando comparado com a H8 da smUPaapo, possivelmente devido a maior liberdade de variação conformacional dos *loops*. A maioria dos aminoácidos divergentes entre as smUPs se distribuem em posições espacialmente próximas ao sítio ativo do homodímero, especialmente na região do L17 e proximidades (**Figura 42**). Dentre os 14 resíduos que compõem este *loop*, há cinco posições com divergências entre as isoformas (A256V, G262T, Q264E, I265V e I267T). A ausência de densidade eletrônica nesta região da smUPb sugere uma maior flexibilidade deste *loop* em relação ao seu homólogo, a smUPa (**Figura 43**). As divergências certamente

auxiliam na promoção desta característica, pois a introdução de dois aminoácidos hidrofílicos (G262T e I267T) e um resíduo carregado negativamente (Q264E) aumentam a capacidade de interação com o solvente. No entanto, sendo esta a única via de acesso do solvente ao sítio, a conformação bem definida do L17 na estrutura da smUPaapo não permite que o sítio de ligação possa interagir com o moléculas presentes no solvente. Desse modo, este loop precisa necessariamente ser capaz de em algum momento adotar uma conformação diferente da observado no modelo cristalográfico para que a enzima seja capaz de realizar sua função. É possível que a estabilidade do L17 observada seja uma consequência do empacotamento da estrutura cristalina e quando em solução seja energeticamente mais favorável que este assuma outras conformações que permitam a exposição do sítio ao solvente. Simulações por dinâmica molecular das estruturas smUPa e smUPb em solução poderão auxiliar a entender melhor este fenômeno e levantar informação sobre a real existência de diferenças de flexibilidade deste loop entre as isoformas.

As trocas E183K e R278L contribuem para uma maior mobilidade do L12 da smUPb. Na smUPa a única interação entre o L12 e a H8 é uma ponte salina entre o E183 e R278, o que restringe a liberdade de movimentação do *loop*. Dedico a troca em ambas as posições na smUPb, provavelmente levando a uma maior flexibilidade do L12 (**Figura 44**).

A troca de aminoácidos do sítio ativo entre as smUPs consistem em M93I, G126D, Q201L e A256V. Os demais resíduos apresentam conformações similares (**Figura 45**). Apesar de ocorrer entre aminoácidos semelhantes e não fazer contato direto com o ligante, outra troca de aminoácidos importante é a I265V, pois este resíduo se encontra em uma posição próximo ao sítio ativo. O principal impacto no sítio da smUPb é a perda da capacidade de formação de ligações de hidrogênio diretamente com a base nitrogenada devido a substituição da glicina 126 por ácido aspártico e a diminuição do espaço disponível para acomodação de um substrato devido a impedimentos estéricos gerados pela trocas Q201L (**Figura 46 e 49**). Os resíduos que interagem com a ribose são todos conservados entre as UPs e, apesar das divergências no sítio entre as smUPs, a cavidade onde a ribose interage é conservada (**Figura 47**).

Figura 41 – Sobreposição da smUPbapo e smUPaapo. Região do L12 e L17 (círculos) estão ausentes na estrutura da smUPbapo.

Figura 42 - Distribuição espacial das divergências a nível de estrutura primária (vermelho) entre a smUPa e smUPb. Figura baseada na estrutura smUPa+timidina.

Figura 43 – Mapa de densidade eletrônica da região correspondente ao L17 (amarelo) (A) da smUPbapo e da (B) smUPaapo. A figura mostra a falta de densidade eletrônica no trecho que corresponde aos resíduos 262-267 do L17 da smUPbapo, o que não ocorre para a estrutura da smUPaapo que apresenta o mapa de densidade eletrônica bem definido nesta região. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ da smUPbapo em A e da smUPaapo em B; $\sigma=1.0$.

Figura 44 – Conformação ausente do L12 da smUPbapo (verde), provável consequência da troca de aminoácidos R278L entre as isoformas. Na smUPaapo (azul) a R278 forma uma ligação de hidrogênio com a E183, enquanto a L278 da smUPbapo (vermelho) elimina essa possibilidade de interação entre o L12 e o H8.

Os resíduos que realizam contato com o fosfato também apresentam as mesmas conformações da smUPaapo. Com base nessas diferenças entre resíduos do sítio ativo, a estrutura da smUPb obtida neste trabalho permite afirmar que ou a ligação ao substrato ocorre de uma maneira completamente diferente da smUPa ou a smUPb não é capaz de realizar a fosforólise reversível da uridina, por não ser capaz de se ligar ao nucleosídeo. Ambas as alternativas auxiliam a explicar a não obtenção da estrutura da smUPb interagindo com timidina, timina, uracil e 5-fluorouracil.

Figura 45 – Sobreposição dos resíduos que compõem o sítio ativo da smUPbapo (laranja) e smUPaapo (azul). Os resíduos divergentes (M93I, G126D, Q201L e A256V) da smUPb indicados em vermelho. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ da smUPbapo; $\sigma=1.0$

Figura 46 – Impacto de Q201L e G126D no sítio ativo da smUPb (laranja) em relação a smUPa (azul). Imagem gerada a partir da sobreposição da smUPbapo e smUPa+Timidina.

Figura 47 – Superfície dos resíduos que compõem o sítio de ligação ao nucleosídeo da smUPb(A) e smUPa(B). A troca de uma glicina por um aspartato na posição 126 elimina a cavidade que acomoda a base nitrogenada (círculo), de modo que no sítio ativo da smUPb somente a cavidade que interage com ribose é conservada.

Os resíduos que compõem a interface entre os monômeros são praticamente os mesmos, com exceção de M93I, Q201L, D205N. As consequências de M93I e Q201L aparentam estar restritas ao sítio ativo. A D205 da smUPa forma ligações

de hidrogênio com os resíduos K107(B) e Q264(A), enquanto a N205 da smUPb forma com os resíduos K107(B) e D18(B). O resíduo Q264 faz parte do L17, a smUPb apresenta um glutamato (E264) nessa posição e não foi possível determinar sua conformação. Uma vez que com a troca D205N é acompanhada da perda de um contato do L17, parece contribuir para uma maior mobilidade do L17 da smUPb. Os demais resíduos divergentes, quatro estão expostos ao solvente (I164K, L167S, T169A, I236* e I267T). A I164K, L167S e I267T eliminam um resíduo hidrofóbico e adicionam um resíduo hidrofílico, somente a T169A que a smUPb ocorre no sentido inverso. Normalmente mudanças em resíduos expostos ao solvente possuem pouco impacto na função de uma enzima, pois são facilmente acomodados sem induzir grandes mudanças na estrutura, o que torna plausível a hipótese que essas divergências não contribuam significativamente para diferenças funcionais entre as smUPs. No entanto, se a troca de aminoácidos ocorrer em uma região de interação proteína-proteína ou em um possível sítio alostérico, seu impacto pode consistir na promoção de diferenças a nível de regulação significativa dentro do contexto metabólico, acentuando as diferenças funcionais entre smUPa e smUPb. Esse tipo de fenômeno é relativamente comum em doenças humanas associadas à polimorfismos, como a doença de Charcot-Marie-Tooth, Alzheimer e a doença de Creutzfeldt-Jacob¹¹⁵. Apesar de pouco plausível, a ausência de informação sobre a existência de interfaces de interação entre smUPs e possíveis proteínas reguladoras não permite eliminar com confiança a hipótese que essas divergências não gerem diferenças funcionais significativas entre as isoformas.

3.8 SmUPb+Citrato

Uma das estruturas da smUPb obtidas apresentou citrato ocupando o sítio de ligação, smUPb+citrato ao fosfato de apenas um dos sítios ativos presentes no homodímero (**Figura 48**). O citrato forma ligações de hidrogênio com sete resíduos (G46, R50, R121, T124, E234, E276 e R76(B)) e os demais resíduos dessa região apresentam as mesmas conformações da região observada no sítio

da smUPa, com exceção do resíduo R50 (**Figura 49**). O outro sítio não ocupado da smUPb+citrato apresenta as mesmas características do sítio da smUPa.

Figura 48 – Sítio ativo da smUPb ocupada por uma molécula de citrato. O citrato ocupa região equivalente ao sítio de ligação ao fosfato. Todos os resíduos pertencem a cadeia A, com exceção do R77 que pertence a cadeia B. Comprimento das ligações de hidrogênio. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ da smUPb+Citrato; $\sigma=1.0$

Figura 49 – Sobreposição da região do sítio de ligação B, não ocupado pelo citrato (azul), e A, ocupado pelo citrato (verde e transparente) do dímero AB da smUPb-citrato. Os resíduos apresentam as mesmas conformações, com exceção da R50.

Não há grandes mudanças conformacionais devido a ligação ao citrato. No entanto, ao contrário da smUPb_{apo}, foi possível determinar a conformação do L17 da cadeia A, que está próximo ao sítio ocupado pelo citrato, com exceção da região final do L17 que apresentou um mapa de densidade eletrônica pouco definida (resíduos T266 e T267). O L17 da cadeia B, que está próximo ao sítio do homodímero não ocupado, apresentou um mapa de densidade eletrônica pouco definido apenas na região dos dois últimos resíduos (T266 e T267) (**Figura 50**). A presença do citrato no sítio parece contribuir com a redução da flexibilidade do L17 do sítio ativo da smUPb. A presença do citrato no sítio ativo da smUPb provavelmente é resultado da condição de cristalização a qual a proteína foi submetida. Dificilmente essa capacidade de interagir com esta molécula possui alguma relevância metabólica para o *S. mansoni*, mas essa característica pode trazer informações úteis para auxiliar a busca por possíveis moléculas com as quais essa isoforma é capaz de interagir.

Figura 50 – Mapa de densidade eletrônica do L17 do sítio ocupado pelo citrato (A) e sítio não ocupado (B) da smUPb-citrato. Largura da região sem densidade eletrônica expressa em angströms. Mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ da smUPb+citrato; $\sigma=1.0$

3.9 Comparação das SmUPs com UPs humanas e de outros organismos

Atualmente existem 57 estruturas de uridina fosforilase (EC 2.4.2.3) depositadas no PDB, das quais somente 17 pertencem a eucariotos. Essas se distribuem em quatro organismos: *Plasmodium falciparum* (sete), *Toxoplasma gondii* (uma), *Bos Taurus* (três) e *Homo sapiens* (seis). Somente a UP de humanos possui estruturas das duas isoformas, hUP1 e hUP2, embora seja uma característica comum entre vertebrados. Baseado no TM-score e RMSD calculado a partir do alinhamento estrutural entre as smUPs e algumas das estruturas presentes no PDB é possível concluir que as smUPs apresentam o mesmo enovelamento das demais estruturas de UPs conhecidas, como esperado (**Tabela 11**). No entanto, as smUPs são estruturalmente mais próximas das UPs de *Homo sapiens* (hUP) e *Bos Taurus* quando comparadas com as UPs de eucariotos unicelulares e procariotos. Em organismos menos complexos, as UPs normalmente se apresentam como hexâmeros e a necessidade de mais de uma interface de contato por monômero, pode contribuir para distanciamento estrutural das estruturas de organismos mais complexos.

Tabela 11 - TM-score e RMSD calculado pelo Talign entre os monômeros de smUPa e UPs de outros organismos.

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Salmonella</i>
TM-score ¹	0,95	0,93	0,75	0,70	0,70	0,67
RMSD	1,21	1,61	3,35	2,89	3,10	2,62

¹ O TM-score assume valores entre 0 e 1. TM-score <0.17 corresponde a um similaridade randômica, TM-score > 0.5 geralmente corresponde ao mesmo fold no SCOP/CATH. A definição do TM-score é independente do tamanho da proteína. OBS: O PDB code das estruturas utilizadas na comparação são: 3NBQ (*Homo sapiens*), 3KU4 (*Bos taurus*), 3BJE (*Toxoplasma gondii*), 3MB8 (*Strptococcus pyogenes*) e 2HRD (*Salmonella*).

As hUP1 e hUP2 compõem o único caso de diferentes versões da UP em um mesmo organismos com estruturas atualmente disponível no PDB. A hUP2 compartilha ~62% de identidade com hUP1 e não apresentam diferenças significativas quanto a composição do sítio ativo. Ambas possuem características cinéticas similares ($V_{\max}/K_m$ igual a 0.95 e 1.13 para hUP1 e hUP2, respectivamente)⁹². No entanto, a atividade da hUP2 é sensível ao estado redox

do ambiente, efeito mediado pelo deslocamento de uma arginina do sítio ativo por consequência da formação de uma ponte dissulfeto, inviabilizando a ligação adequada com o substrato, mecanismo ausente na hUP1⁹². Essa característica torna viável a atuação da hUP2 como um sensor de estresse oxidativo, via possíveis associação ou dissociação com interação outros elementos regulatórios e desencadeando a resposta celular ao quadro de estresse⁹². É plausível que a principal diferença entre as isoformas humanas seja a capacidade de interagir com proteínas reguladoras, pois apesar das divergências na estrutura primária serem ~40%, não há diferenças significativas entre seus sítios ativos e atividade enzimática⁹². O cenário das UPs de *S. mansoni* é o oposto das humanas, as duas isoformas são muito semelhantes (92% de identidade), mas apresentam grandes divergências na composição do sítio ativo. Quando comparadas com as hUPs, a o grau de identidade entre as smUPs e isoformas humanas (smUPa vs hUP1, 44%; smUPa vs hUP2, 42%; smUPb vs hUP1, 40%; smUPb vs hUP2, 39%) é aproximadamente o mesmo entre as duas isoformas, de modo que não é possível fazer nenhuma correspondência entre a hUP1 e hUP2 e smUPa e smUPb. .

Comparado com a hUP1, o sítio ativo da smUPa+timidina possui essencialmente os mesmos resíduos com conformações similares (**Figura 51**), com exceção do resíduo M231 (cuja posição equivalente na hUP1 é ocupada por uma isoleucina). É provável que esta isoforma possua potencial de ligação a determinados substratos semelhante ao das hUPs. A perda da capacidade de interagir diretamente com a base nitrogenada do nucleotídeo na smUPb faz com que o sítio apresente características inéditas dentro das UPs com estruturas conhecidas.

A semelhança do sítio ativo smUPa em relação ao sítio das hUPs faz com que esta enzima não seja um bom candidato a um novo alvo terapêutico para tratamento da esquistossomose humana. De modo que, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas explorando outras enzimas da via de salvação de pirimidinas poderão ser mais promissoras. Por outro lado, devido a diferenças importantes no sítio ativo da smUPb em relação as demais UPs conhecidas, somente após a caracterização funcional da smUPb será possível avaliar a real função desta enzima e a viabilidade de utiliza-la como alvo terapêutico

3.10 Implicações biológicas das estruturas das smUPs

A razão pela qual essas duas isoformas de UPs existem e são mantidas no genoma do *Schistosoma mansoni* é uma questão atualmente sem resposta, mesmo em organismos onde as UPs são relativamente bem caracterizadas, como humanos e camundongos, embora avançada, a questão permanece em aberto.

As duas isoformas da UP presentes no *S. mansoni* não permitem construir conclusões totalmente paralelas ao que se sabe sobre o caso das UPs de vertebrados (discutidos na introdução). As estruturas obtidas da smUPa e smUPb são praticamente idênticas e apresentam todas as características clássicas de membros da família NP-1. Apesar das poucas divergências a nível estrutura primária, as diferenças entre os aminoácidos que compõem o sítio ativo são significativas e devem ter impacto na atividade enzimática das isoformas, o que não ocorre no caso das isoformas de vertebrados. As diferenças entre as isoformas se concentram em torno do sítio ativo e poucas são em regiões expostas ao solvente. A principal diferença entre as isoformas implica que ou o substrato se liga de uma maneira completamente diferente da observada na smUPa ou a smUPb não é capaz de catalisar a fosforólise reversível da uridina.

Além disso, é pouco plausível a existência de diferenças significativas quanto a potencialidade de interação com possíveis proteínas reguladoras entre as isoformas. Sem evidências experimentais da real atividade da smUPb não há como fazer afirmações com segurança sobre seu papel biológico. No entanto, as diferenças do sítio ativo em relação a smUPa e a não obtenção de estruturas cristalográficas da smUPb com ligantes permitem supor que a estrutura da smUPb apresentada neste trabalho ou é um representante de um estado não funcional (supondo que existe um funcional) ou a smUPb não é capaz de interagir com

nenhum dos ligantes testados (que devido à ausência do Q201 aparenta ser a mais provável).

Figura 51 – Alinhamento estrutural entre os aminoácidos que compõem o sítio da smUPa, em laranja, e hUP1 (3NBQ), em azul. Os sítios ativos apresentam essencialmente os mesmos resíduos compondo o sítio ativo com conformações semelhantes. Existe uma única exceção, a hUP1 apresenta uma isoleucina na posição equivalente ao resíduo M231 da smUPa (círculo vermelho).

A principal diferença entre o sítio ativo da smUPb em relação a smUPa é a perda da capacidade de interagir com O₂ e N₃ da base nitrogenada, devido a Q201L, e a perda de espaço para acomodação do substrato, devido a G126D. Desse modo, se a smUPb apresentar atividade de UP, para viabilizar a catálise, a estrutura precisará passar por mudanças conformacionais que restabeleçam essa capacidade. Não há nenhuma Glutamina ou Asparagina próxima do sítio ativo, de modo que é pouco plausível a existência de um mecanismo para a recuperação desta característica pelo reposicionamento de algum resíduo. Um mecanismo sensível ao estresse oxidativo via formação de pontes dissulfeto nos moldes do presente na UP2 de vertebrados também parece pouco provável nas smUPs. Nenhuma das estruturas observadas apresentou pontes dissulfeto, além disso não há cisteínas exclusivas de apenas uma das isoformas e a posição das

cisteínas apresentada pelas estruturas obtidas torna a formação de pontes dissulfeto pouco provável como um mecanismo de ativação redox dependente. As predições teóricas do valor de pKa das cisteínas (dados não apresentados) sugerem que não há cisteínas com pKa abaixo da média comum ou diferenças significativas entre as isoformas. Desse modo, além de pontes de sulfetos, as demais mudanças pós-traducionais baseadas em modificações de cisteínas também são pouco plausíveis¹¹⁶ entre as smUPs.

Considerando que a smUPb não seja capaz de interagir com nenhum dos ligantes testados nesse trabalho, consequentemente, ela também não será capaz de catalisar a fosforólise reversível da uridina. Neste caso, uma possível explicação para sua existência e permanência neste organismo é um evento de duplicação gênica recente na história evolutiva do *S. mansoni*. Eventos de duplicação parecem ser comuns na história evolutiva do *S. mansoni*. Em um recente estudo filogenético foi identificado que ~45% das proteínas putativas presentes no *S. mansoni* possuem pelo menos um parálogo que deve ter surgido depois do organismo divergir de um determinado táxon¹¹⁷. Neste mesmo estudo foi identificado várias sequências específicas do *S. mansoni* que provavelmente são resultado de duplicações muito recentes, no entanto a maior parte não contem domínios identificáveis via Pfam e a comparação com sequências do banco de dados do NCBI retorna alinhamentos somente com proteínas hipotéticas em todos os casos¹¹⁷.

Uma busca via BLAST no banco de dados não redundante (nr) do NCBI utilizando as sequências das smUPs, permite identificar que não há sequências similares as smUPs nas demais espécies de Schistosoma disponíveis no banco de dados. No entanto, não existem genomas completos das demais espécie de Schistosoma disponíveis atualmente, de modo que não é possível excluir por completo a possibilidade da presença desses genes nas demais espécies. Os principais resultados (40-50% de identidade, o alinhamento cobrindo <90% da sequência e *max score* < 200) da busca via BLAST são de UPs de vertebrados variados. Ainda que a presença das duas isoformas seja resultado de um evento de duplicação recente é pouco plausível que esta isoforma seja artefato do processo evolutivo, pois durante o processo de clonagem a partir da biblioteca de

cDNA permite concluir que cerca de 90% dos transcritos identificados como smUP são da isoforma da smUPb. De modo que, a smUPb ou é um pseudogene, isto é, gene que é transcrito mas o resultado de sua tradução não gera uma proteína funcional, e não é capaz de catalisar nenhuma reação útil ou ela atua catalisando alguma outro tipo de reação. Além disso, uma vez que a proteína apresenta características de uma enzima real, isto é enovela e é estável, é improvável que o produto deste gene não seja traduzido.

Como pseudogene, a smUPb seria um pseudogene não processado do tipo unitário da smUPa e sua função poderia estar confinada ao controle da expressão do mesmo. A regulação de expressão de um gene funcional por seu pseudogene por mecanismo pós-transcricionais, por exemplo via produção de RNA interferente (siRNA), é um fenômeno relativamente comum^{118–120} e uma explicação plausível para a existência e manutenção da smUPb no genoma do *S. mansonii*. A outra possibilidade envolve ganho de função desta enzima, a importância da smUPb envolveria sua capacidade de catalisar alguma outra reação diferente da fosforólise reversível da uridina. A distribuição espacial das divergências a nível de estrutura primária das smUPs em posições próximas ao sítio ativo é um fenômeno notável, pois as trocas de aminoácidos entre isoformas de UP conhecidas não afetam o sítio ativo e a maior parte se apresentam em regiões expostas ao solvente. Nas isoformas de UPs conhecidas a principal diferença entre elas reside na necessidade de regulação da ação desta enzima em contextos celulares diferentes. Por esta razão, o sítio ativo costuma ser conservado entre as isoformas e as mudanças na composição de aminoácidos se localizam na superfície da proteína. Esse fato permite que uma das isoformas mantenha, por exemplo, interfaces de interação com proteínas reguladoras ou mecanismos de regulação exclusivas de apenas uma delas. Uma vez que a distribuição da maior parte das divergências entre as smUPs ocorre em regiões próximas ao sítio e não na superfície, é plausível que as divergências devem afetar profundamente a função smUPb. Além disso, as mudanças mais drásticas do sítio ativo, especialmente a perda da capacidade de interagir com a base nitrogenada via Q201, a perda de espaço na cavidade do sítio via G126D e a manutenção dos demais resíduos que viabilizam a interação com a ribose e o fosfato podem indicar que esta enzima seja capaz de interagir apenas com a ribose e o fosfato ou

moléculas de natureza semelhante a estas. Uma das funções da UP no contexto metabólico celular é prover o fornecimento de ribose-1-fosfato para viabilizar fontes de energia alternativa importantes para a célula diante de um quadro de privação de oxigênio, ou mesmo para o processo de acetilação de proteínas. Reações enzimáticas envolvendo fosforólise reversível visando apenas o fornecimento de ribose-1-fosfato pode ser uma possibilidade da capacidade catalítica da smUPb. Uma vez que a importância da UP no efeito protetor contra isquemia (que envolve restrição no fornecimento de oxigênio) e para a via de acetilação de proteínas é mediada pela ribose-1-fosfato, a manutenção desta isoforma especializada para garantir o fornecimento dessa molécula e mediar estes efeitos pode ser válido.

Considerando a mudança de ambiente que o *S. mansoni* é submetido enquanto no corpo do organismo hospedeiro e o fato de se instalar em veias que drenam determinados órgãos, existe a necessidade de se expor a ambientes nos quais a oferta de oxigênio é reduzida. Mecanismos que diminuam ao máximo possível o dano celular são uma necessidade imposta pelo meio ao parasita, especialmente para as células que compõem o sistema nervoso. Devido a importância da atividade da UP em mecanismos de proteção a danos causado por isquemia em outros organismos, é plausível que a manutenção de uma segunda isoforma da UP esteja envolvida com a maior eficiência desta isoforma em suprir as demandas celulares por ribose-1-fosfato para o processo de proteção contra danos por restrição do fornecimento de oxigênio e para o processo de acetilação de proteínas.

Apesar de a relação entre UP e o metabolismo de lipídio também poder ser mediada pela ribose-1-fosfato a relação entre UP e metabolismo de lipídio, se houver alguma relação esta não é mediada pela produção de β -alanina. No caso do *S. mansoni*, apesar de possuir todos os genes para a maioria dos processos metabólicos centrais, como, por exemplo, glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico e via das pentose-fosfato, são incapazes de realizar a síntese de novo de esteróis ou ácidos graxos livres, portanto, precisam de precursores complexos do hospedeiro⁶⁸, de modo que, a utilização da β -alanina como elo entre smUP e a regulação do metabolismo de lipídios é inviável para este parasita.

4 Conclusão

As estruturas obtidas no presente trabalho permitem concluir que as duas isoformas da smUP apresentam essencialmente o mesmo enovelamento, com poucas diferenças nas regiões expostas ao solvente. O sítio ativo das duas smUPs exige necessariamente que o L17 seja flexível, de modo a viabilizar acesso do solvente ao sítio ativo. A principal diferença entre as isoformas reside no fato do sítio da smUPa apresentar todos os resíduos essenciais identificados nas demais UPs conhecidas, enquanto o sítio da smUPb, não. Aparentemente a smUPb não é capaz de catalisar a fosforólise reversível da uridina e, possivelmente, é responsável por catalisar alguma outra reação, provavelmente envolvendo fosfato e ribose (ou moléculas semelhantes). Outra possibilidade é que a smUPb seja na verdade um pseudogene.

Uma vez que a smUPa apresenta o sítio ativo semelhante ao da hUP1 e hUP2, sua viabilidade como possível alvo terapêutico para tratamento da esquistossomose humana não parece promissora. A smUPb, por outro lado, apresenta um sítio ativo atípico quando comparada as demais UPs conhecidas, apesar de possível somente a sua caracterização funcional será possível avaliar a viabilidade de sua utilização como alvo terapêutico. Testes de atividade enzimática com diferentes ligantes, auxiliados por ferramentas conformacionais, como *virtual screening*, serão realizados com o intuito de esclarecer qual a real capacidade catalítica, se houver, desta isoforma.

A caracterização funcional *in vitro* e ensaios de cinética enzimática esclarecerão as reais capacidades catalíticas da smUPa e smUPb e auxiliará a determinar a importância das smUPs no contexto metabólico do *Schistosoma mansoni*.

REFERÊNCIAS

- 1 BOBEK, L.; REKOSH, D. Characterization of a female-specific cDNA derived from a developmentally regulated mRNA in the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n.15, p. 5544–5548, Aug.1986.

- 2 ROBERTS, L.S. et al. **Foundations of parasitology**. New York: Janice Roerig-Blong, 2009. 253p.

- 3 SENFT, A.; CRABTREE, G. Purine metabolism in the schistosomes: potential targets for chemotherapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 20, n. 3, p. 341, 1983.

- 4 AOKI, T.; OYA, H. Glutamine-dependent carbamoyl-phosphate synthetase and control of pyrimidine biosynthesis in the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry**, v. 63, n. 4, p. 511–5, 1979.

- 5 HILL, B. et al. The enzymes of pyrimidine biosynthesis in a range of parasitic protozoa and helminths. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 2, n. 3-4, p. 123–34, 1981.

- 6 KOUNI, M. EL; NAGUIB, F. Pyrimidine salvage pathways in adult *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 37–44, 1990.

- 7 JORDAN, P. From katayama to the Dakhla Oasis: the beginning of epidemiology and control of bilharzia. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p. 9–40, 2000.

- 8 MAHMOUD, A. A F. Schistosomiasis (bilharziasis): from antiquity to the present. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, n. 2, p. 207–18, 2004.

- 9 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO – schistosomiasis**: fact sheet nº 115. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en>>. Acesso em: 18 de julho de 2013.
- 10 LIU, Y. The Han tombs of mawangdui changsha. In:----- ; **Human People's Publishing House**. Shangai: [s.e], 1978.p. 1–47.
- 11 DEELDER, A.M. et al. Detection of schistosome antigen in mummies. **The Lancet**, v. 335, n. 8691, p. 724–725, 1990.
- 12 MILLER, R.L. et al. Palaeoepidemiology of Schistosoma infection in mummies. **British Medical Journal (Clinical Research ed.)**, v. 304, n. 6826, p. 555–6, 1992.
- 13 HULSE, E. V Joshua's curse and the abandonment of ancient Jericho: schistosomiasis as a possible medical explanation. **Medical History**, v. 15, n. 4, p. 376–86, 1971.
- 14 ADAMSON, P.B. Schistosomiasis in antiquity. **Medical History**, v. 20, n. 02, p. 176–188, 1976.
- 15 BIGGS, H.E.J. Mollusca from pre-historic Jericho. **Journal of Conchology**, n. 24, p. 379–387, 1960.
- 16 SASA, M. A historical review of early japanese contributions to the knowledge of Schistosomiasis Japonicum. In: YOKOGAWA, M (Ed.); **Researches in Filariasis and Schistosomiasis**. Baltimore: University Park Press, 1972. p. 531–536.
- 17 LEIPER, R.T. Report on the results of the bilharzia mission to Egypt. **Journal of Royal Army Medical Corps**, n. 30, p. 235–253, 1918.
- 18 TANAKA, H.; TSUJI, M. From discovery to eradication of schistosomiasis in Japan: 1847-1996. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 12, p. 1465–80, 1997.

- 19 SAMBON, L.W. New or little know African entozoa. **Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 117.77 (2000), p. 9–40, 1907.
- 20 FUJINAMI, K.; NARABAYASHI, H. Prevention of schistosomiasis japonicum by mixing lime in infective water. **Chugai Liji Shimpo**, v. 34, p. 649–657, 1913.
- 21 ROBSON, G.C. Note on “Katayama nosophora.” **British Medical Journal**, v. I, p. 203, 1915.
- 22 LEIPER, R.T. Report on the results of the Bilharzia mission in Egypt. **Journal of the Royal Army Medical Corps**, v. 25, n. 1, p. 2, 1915.
- 23 LEIPER, R.T. On the relation between the terminal-spined and lateral-spined eggs of Bilharzia. **British Medical Journal**, v. 1, n. 2881, p. 411, 1916.
- 24 MANSON, P. **Lectures on tropical diseases**. London: Con-stable, 1905.54p.
- 25 CHRISTOPHERSON, J.B. ; KAY, C. G.Schistosomiasis vel bilharziasis.. **British Journal of Surgery**, v. 13, n. 52, p. 772–772, 1926.
- 26 GONNERT, R.; ANDREWS, P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Zeitschrift for Parasitenkunde**, v. 52, n. 2, p. 129–150, 1977.
- 27 SEUBERT, J.; POHLKE, R.; et al. Synthesis and properties of Praziquantel, a novel broad spectrum anthelmintic with excellent activity against Schistosomes and Cestodes. **Experientia**, v. 33, n. 8, p. 1036–7, 1977.
- 28 WORLD HEALTH ORGANIZATION. The control of schistosomiasis: second report of WHO experts committee. **Technical Report Series**, v. 830, p. 1–86, 1993.

- 29 FENWICK, A. The global burden of neglected tropical diseases. **Public Health**, v. 126, n. 3, p. 233–6, 2012.
- 30 HOTEZ, P.J. et al. Neglected tropical diseases of the middle east and north africa: review of their prevalence, distribution, and opportunities for control. **Public Library of Science Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1475, 2012.
- 31 STEINMANN, et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, p. 411–25, 2006.
- 32 YOKOGAWA, M. Control of Schistosomiasis in Japan. In: MILLER, M. J. (Ed.); **Proceeding of a Symposium on the Future of Schistosomiasis Control**. Louisiana: Tulane University, 1972. p. 129–132.
- 33 HILLYER, G. V et al. Age-specific decrease in seroprevalence of schistosomiasis in Puerto Rico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 2, p. 313–8, 1999.
- 34 LAAMRANI, H. et al. New challenges in schistosomiasis control in Morocco. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p. 61–7, 2000.
- 35 ENGELS, D. et al. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Tropica**, v. 82, n. 2, p. 139–46, 2002.
- 36 UTZINGER, J. et al. Conquering schistosomiasis in China: the long march. **Acta Tropica**, v. 96, n. 2-3, p. 69–96, 2005.
- 37 LERER, L.B.; SCUDDER, T. Health impacts of large dams. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 19, n. 2, p. 113–123, 1999.

- 38 FENWICK, A. Waterborne infectious diseases--could they be consigned to history? **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1077–81, 2006.
- 39 LI, Y.-S. et al. Large water management projects and schistosomiasis control, Dongting Lake region, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 973–9, 2007.
- 40 ZHOU, X.-N. et al. Potential impact of climate change on schistosomiasis transmission in China. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 2, p. 188–94, 2008.
- 41 WANG, W. et al. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1871–7, 2012.
- 42 MILLAN, E.P.; KEIM, L.S. Esquistossomíase mansônica. In: TAVARES, W., LAC Marinho (Ed.); **Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 345–50.
- 43 COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5 Suppl 1, p. 13–9, 2004.
- 44 CONCEIÇÃO, M.J., COURA, J.R. Epidemiology of *Schistosomiasis mansoni* in Brazil. In: ROKNI, M.B, (Ed.); **Schistosomiasis**.Shangai: In Tech, 2012,
- 45 CHITSULO, L. et al. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p. 41–51, 2000.
- 46 DAVIES, S.J. et al. Modulation of blood fluke development in the liver by hepatic CD4+ lymphocytes. **Science**, v. 294, n. 5545, p. 1358–61, 2001.

- 47 CASTELLANOS HURTADO, A.A. et al. Frequency of liver flukes in bovines in federal inspection slaughter-houses in Mexico from 1979 to 1987. (Technical note). **Veterinaria Mexico**, v. 23, n. 4, p. 339-342, 1992.
- 48 VERBRUGGE, L.M. et al. Prospective study of swimmer's itch incidence and severity. **The Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 697-704, 2004.
- 49 GEARNER, G.W.; KEMP, W.M. Electrophoretic and serological analysis of host antigens associated with the adult *Schistosoma mansoni* tegument. **The Journal of Parasitology**, v. 80, n. 2, p. 275-83, 1994.
- 50 SKELLY, P.J.; ALAN WILSON, R. Making sense of the schistosome surface. **Advances in Parasitology**, v. 63, p. 185-284, 2006.
- 51 BENNETT, J.L.; THOMPSON, D.P. **Mode of action of antitrepatodal agents**. New York: Plenum Press, 1986.427-443p.
- 52 STRICKLAND, G.T.; RAMIREZ, B.L. **Schistosomiasis**. Philadelphia: W. B. Saunders Co, 2000.804-832p.
- 53 DOENHOFF, M.J., et al. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 659-67, 2008.
- 54 CHEN, M.-G. Use of praziquantel for clinical treatment and morbidity control of schistosomiasis japonica in China: a review of 30 years' experience. **Acta Tropica**, v. 96, n. 2-3, p. 168-76, 2005.
- 55 RIBEIRO-DOS-SANTOS, G. et al. Schistosomiasis--a century searching for chemotherapeutic drugs. **Parasitology Research**, v. 99, n. 5, p. 505-21, 2006.

- 56 DOENHOFF, M.J.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 4, n. 2, p. 199–210, 2006.
- 57 CAFFREY, C.R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 4, p. 433–9, 2007.
- 58 BONESSO-SABADINI, P.I.P.; SOUZA DIAS, L.C. DE Altered response of strain of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 381–5, 2002.
- 59 DANSO-APPIAH, A.; VLAS, S.J. DE Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 3, p. 125–9, 2002.
- 60 LAWN, S.D. et al. Case report: *Schistosoma mansoni* infection: failure of standard treatment with praziquantel in a returned traveller. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 1, p. 100–1, 2003.
- 61 MELMAN, S.D. et al. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. **Public Library of Science Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. e504, 2009.
- 62 LIANG, Y.-J.; et al. New insight into the antifibrotic effects of praziquantel on mice in infection with *Schistosoma japonicum*. **Public Library of Science One**, v. 6, n. 5, p. e20247, 2011.
- 63 LIANG, Y.-S. et al. Studies on resistance of *Schistosoma* to praziquantel XIII resistance of *Schistosoma japonicum* to praziquantel is experimentally induced in laboratory. **Chinese Journal of Schistosomiasis Control**, v. 23, n. 6, p. 605–10, 2011.
- 64 SENFT, A.W.; et al. Purine metabolism in *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, v. 2, n. 2, p. 249–60, 1972.

- 65 CRABTREE, G.W.; SENFT, A.W.. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni* -- V Adenosine cleavage enzyme and effects of purine analogues on adenosine metabolism in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 23, p. 649–660, 1974.
- 66 MIECH, R.P. et al. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*–VI adenosine phosphorylase. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 407–411, 1975.
- 67 SENFT, A.W.; et al. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni* - II. **Biochemical Pharmacology**, v. 22, p. 437–447, 1973.
- 68 BERRIMAN, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352–8, 2009.
- 69 ROMANELLO, et al. Adenosine kinase from *Schistosoma mansoni*: structural basis for the differential incorporation of nucleoside analogues. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 69, n. Pt 1, p. 126–36, 2013.
- 70 D'MUNIZ PEREIRA, et al. Purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni* in complex with ribose-1-phosphate. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 18, n. 1, p. 62–5, 2011.
- 71 PEREIRA, H.M., et al. Crystal structure of *Schistosoma* purine nucleoside phosphorylase complexed with a novel monocyclic inhibitor. **Acta Tropica**, v. 114, n. 2, p. 97–102, 2010.
- 72 MARQUES, I. DE A. et al. Structural and kinetic studies of *Schistosoma mansoni* adenylate kinases. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 185, n. 2, p. 157–60, 2012.
- 73 KOUNI, M.H. et al. Uridine phosphorylase from *Schistosoma mansoni*. **Journal of Biological Chemistry** v. 263, n. 13, p. 6081–6086, 1988.

- 74 LEVENE, P.A.; WEBER, I. On nucleosidases. II. Purification of the enzyme. **Journal of Biochemistry**, v. 60, p. 707–720, 1924.
- 75 DEUSTSCH, W.; LASER, R. Experimentelle studien u6 ber den nucleinstoffwechsel. XIX. Mitteilung. Zur kenntnis der nucleosidase. **Verhalten einer nucleosidase aus rinderknochenmark zu einem splatprodukt der thymusnucleinsa6 ure.** v. 186, p. 1–10, 1930.
- 76 KLEIN, W. Experimentelle studien u6 ber den nucleinstoffwechsel. XXXVII. Ua ber nucleosidase. **Zeitschrift. Physiologische Chemie**, v. 231, p. 125–148, 1935.
- 77 CONNOLLY, G.P.; DULEY, J. A Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 5, p. 218–25, 1999.
- 78 CHOI, J.W. et al. Uridine protects cortical neurons from glucose deprivation-induced death: possible role of uridine phosphorylase. **Journal of Neurotrauma**, v. 25, n. 6, p. 695–707, 2008.
- 79 LIU, M.P.; et al. Discrete roles of hepatocytes and nonparenchymal cells in uridine catabolism as a component of its homeostasis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 274, n. 6, p. G1018–1023, 1998.
- 80 LE, T.T. et al. Disruption of uridine homeostasis links liver pyrimidine metabolism to lipid accumulation. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 4, p. 1044–57, 2013.
- 81 ZHANG, Y. et al. Identification of a liver-specific uridine phosphorylase that is regulated by multiple lipid-sensing nuclear receptors. **Molecular Endocrinology** v. 18, n. 4, p. 851–62, 2004.
- 82 WATANABE, S.I.; UCHIDA, T. Cloning and Expression of Human Uridine Phosphorylase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 216, n. 1, p. 265–272, 1995.
- 83 JOHANSSON, M. Identification of a novel human uridine phosphorylase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, n. 1, p. 41–46, 2003.
- 84 TANNER, J.J. et al. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases: structural and chemical aspects. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 1, p. 77–97, 2011.

- 85 CAO, D.; et al. Abnormalities in uridine homeostatic regulation and pyrimidine nucleotide metabolism as a consequence of the deletion of the uridine phosphorylase gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 22, p. 21169–75, 2005.
- 86 CAO, D. et al. Uridine phosphorylase (â''/â'') murine embryonic stem cells clarify the key role of this enzyme in the regulation of the pyrimidine salvage pathway and in the activation of. **Cancer Research**, v. 62, n 8, p. 2313-7, 2002.
- 87 RUSSELL, R.L. et al. Uridine phosphorylase association with vimentin. Intracellular distribution and localization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 16, p. 13302–7, 2001.
- 88 KONG, X.; et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha enhances antiproliferative activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine in cancer cells through induction of uridine phosphorylase. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 854–60, 2009.
- 89 KANZAKI, A. et al. Expression of uridine and thymidine phosphorylase genes in human breast carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 97, n. 5, p. 631–5, 2002.
- 90 LASHKOV, A. A. et al. Uridine phosphorylase in biomedical, structural, and functional aspects: A review. **Crystallography Reports**, v. 56, n. 4, p. 560–589, 2011.
- 91 LEE, C.S. et al. Purification and characterization of uridine (thymidine) phosphorylase from *Giardia lamblia*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 30, n. 3, p. 271–277, 1988.
- 92 ROOSILD, T.P. et al. A novel structural mechanism for redox regulation of uridine phosphorylase 2 activity. **Journal of Structural Biology**, v. 176, n. 2, p. 229–37, 2011.
- 93 KAWAMURA, K. et al. Up-regulated expression of the uridine phosphorylase gene in human gastric tumors is correlated with a favorable prognosis. **Anticancer Research**, v. 26, n. 6C, p. 4647–51, 2006.

- 94 TOZZI, M.G. et al. Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism. **The Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 273, n. 6, p. 1089–101, 2006.
- 95 IPATA, P.L. et al. Metabolic network of nucleosides in the brain. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 909–22, 2011.
- 96 BALESTRI, F. et al. Key role of uridine kinase and uridine phosphorylase in the homeostatic regulation of purine and pyrimidine salvage in brain. **Neurochemistry International**, v. 51, n. 8, p. 517–23, 2007.
- 97 SCHWER, B. et al. Calorie restriction alters mitochondrial protein acetylation. **Aging Cell**, v. 8, n. 5, p. 604–6, 2009.
- 98 ZHAO, S. et al. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. **Science**, v. 327, n. 5968, p. 1000–4, 2010.
- 99 TIEDJE, K.E. et al. Beta-alanine as a small molecule neurotransmitter. **Neurochemistry International**, v. 57, n. 3, p. 177–88, 2010.
- 100 GUARENTE, L. The logic linking protein acetylation and metabolism. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 151–3, 2011.
- 101 PUGMIRE, M.; EALICK, S. Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. **Biochemical Journal**, v. 361, n. 1, p. 1, 2002.
- 102 TRAN, T.H. et al. The crystal structure of *Streptococcus pyogenes* uridine phosphorylase reveals a distinct subfamily of nucleoside phosphorylases. **Biochemistry**, v. 50, n. 30, p. 6549–58, 2011.
- 103 KONRAD, A.; PIŠKUR, J.; et al. The evolution of catalytic residues and enzyme mechanism within the bacterial nucleoside phosphorylase superfamily 1. **Gene**, v. 510, n. 2, p. 154–61, 2012.

- 104 BATTYE, T.G.G. et al. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. Pt 4, p. 271–81, 2011.
- 105 The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography**, v. 50, n. Pt 5, p. 760–3, 1994.
- 106 KABSCH, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. **Acta crystallographica. Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. Pt 2, p. 133–44, 2010.
- 107 WINTER, G. xia2: an expert system for macromolecular crystallography data reduction. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, n. 1, p. 186–190, 2009.
- 108 MCCOY, A.J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. Pt 4, p. 658–674, 2007.
- 109 STEIN, N. CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 41, n. 3, p. 641–643, 2008.
- 110 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126–32, 2004.
- 111 ADAMS, P.D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. Pt 2, p. 213–21, 2010.
- 112 KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **Journal of Molecular Biology**, v. 372, n. 3, p. 774–97, 2007.

- 113 ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 7, p. 2302–9, 2005.
- 114 DAVID, A.; et al. Protein-protein interaction sites are hot spots for disease-associated nonsynonymous SNPs. **Human Mutation**, v. 33, n. 2, p. 359–63, 2012.
- 115 SCHUSTER-BÖCKLER, B.; BATEMAN, A. Protein interactions in human genetic diseases. **Genome Biology**, v. 9, n. 1, p. R9, 2008.
- 116 SPADARO, D. et al. The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. **Physiologia Plantarum**, v. 138, n. 4, p. 360–71, 2010.
- 117 SILVA, L.L. et al. The *Schistosoma mansoni* phylome: using evolutionary genomics to gain insight into a parasite's biology. **BioMed Central Genomics**, v. 13, p. 617, 2012.
- 118 MURO, E.M. et al. Functional evidence of post-transcriptional regulation by pseudogenes. **Biochimie**, v. 93, n. 11, p. 1916–21, 2011.
- 119 TUTAR, Y. Pseudogenes. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2012, p. 424526, 2012.
- 120 PINK, R.C. et al. Pseudogenes: pseudo-functional or key regulators in health and disease? **RNA**, v. 17, n. 5, p. 792–8, 2011.