



FACULDADE PERNAMBUCANA DE SAÚDE - FPS

JOSÉ HENRIQUE SANTOS DA SILVA

ANÁLISE *IN SILICO* DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE ANÁLOGOS DE PURINA
SOBRE A ENZIMA HIPOXANTINA-GUANINA FOSFORRIBOSILTRANSFERASE DE
Schistosoma mansoni.

Recife

2024

JOSÉ HENRIQUE SANTOS DA SILVA

ANÁLISE IN SILICO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE ANÁLOGOS DE PURINA
SOBRE A ENZIMA HIPOXANTINA-GUANINA FOSFORRIBOSILTRANSFERASE DE
Schistosoma mansoni.

Artigo apresentado ao Programa de
Iniciação Científica – PIC 2023-2024
da Faculdade Pernambucana de Saúde
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Farmacêuticas.

Linha de pesquisa: Estudo In silico e Qualitativo

Orientador: Dr. Charles Christophe Du Barrière Mendes

Colaboradora: Bruna Carolina Costa Rafael

Colaborador: Gabriel Leonardo Dantas Marques

Colaboradora: Nathalia Maria Cavalcanti dos Santos

Recife

2024

Charles Christophe Du Barrière Mendes

Docente da Faculdade Pernambucana de Saúde

Graduado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal da Paraíba (2005) com habilitação de Farmacêutico Industrial (2007).

Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Pernambuco (2010).

Doutor em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (2019).

Telefone: (83) 9 8230 7310 | Email: charlescbm@gmail.com

José Henrique Santos da Silva

Acadêmico do 9º período de Farmácia da Faculdade Pernambucana de Saúde-FPS

Telefone: (81) 9 9995-0333 | Email: jhss15@outlook.com

Bruna Carolina Costa Rafael

Acadêmica do 8º período de Farmácia da Faculdade Pernambucana de Saúde-FPS

Telefone: (81) 9 9844-6104 | Email: brunacarolinacosta@hotmail.com

Gabriel Leonardo Dantas Marques

Acadêmico do 8º período de Farmácia da Faculdade Pernambucana de Saúde-FPS

Telefone: (81) 9 9824-9934 | Email: gabrieleonardo@outlook.com

Nathalia Maria Cavalcanti dos Santos

Graduada em Nutrição pela Faculdade Pernambucana de Saúde - FPS

Telefone: (81) 9 8550-9086 | Email: cavalcanti.s.nathalia@gmail.com

JOSÉ HENRIQUE SANTOS DA SILVA

**ANÁLISE *IN SILICO* DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE ANÁLOGOS DE PURINA
SOBRE A ENZIMA HIPOXANTINA-GUANINA FOSFORRIBOSILTRANSFERASE
DE *Schistosoma mansoni*.**

Artigo apresentado ao Programa de
Iniciação Científica – PIC 2023-2024
da Faculdade Pernambucana de Saúde
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Farmacêuticas.

Data de aprovação: ____/____/____.

Dr. Charles Christophe Du Barrière Mendes

FPS- Faculdade Pernambucana de Saúde

Dra. Janaina Goncalves da Silva Melo

FPS- Faculdade Pernambucana de Saúde

Dra. Karinna Moura Boaviagem

Prefeitura do Recife - Setor Judicialização e Padronização

RESUMO

Cenário: A esquistossomose é uma doença negligenciada que atinge cerca de 200 milhões de pessoas anualmente. Devido ao aparecimento de novas linhagens resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado atual, se faz necessário o uso de técnicas computacionais para a descoberta de novos compostos líderes. Enzimas da via de salvação de purinas de parasitas vêm sendo investigadas como um possível alvo terapêutico. Desta forma, almeja-se neste trabalho elucidar, por meio de métodos computacionais, potenciais candidatos a fármacos

esquistossomicidas da classe dos análogos da purina, bem como calcular as energias de ligação, em kcal/mol, dos análogos com o sítio ativo da SmHGPRT do *Schistosoma mansoni*. **Objetivo:** Caracterizar novos potenciais inibidores da enzima HGPRT (Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferase). **Métodos:** Os dados serão processados utilizando os softwares AutoDockTools-1.5.6 e Discovery Studio Visualizer, que são ferramentas especializadas em análise e processamento de dados moleculares para modelagem molecular. Durante o processamento dos dados, o AutoDockTools-1.5. **Discussão:** Os análogos de tamanho e características similares ao AMP obtiveram melhores energias de ligação. A fludarabina se destacou pelo menor resultado estimado de energia de ligação, apresentando -9.68 kcal/mol, devido a sua semelhança com o IMP. A pentostatina apresentou energia estimada de -8,68 kcal/mol, a mercaptopurina, o análogo de menor extensão e peso molecular, apresentou energia estimada do complexo de -5.88 kcal/mol. **Conclusão:** A pesquisa e o desenvolvimento de políticas públicas dedicadas às doenças negligenciadas, em especial à esquistossomose, representam um passo crucial na saúde pública global e no bem-estar de milhares de pessoas que vivem em situação de vulnerabilidade social, a mercê das condições socioeconômicas de seu país de origem. Os resultados *in silico* apresentaram caráter satisfatório, principalmente da fludarabina, pentostatina e azatioprina, que podem ser posteriormente refinados baseado nas diferenças entre a HGPRT humana e a SmHGPRT, na tentativa de aumentar sua potência sobre o parasito e reduzir os efeitos adversos sobre o hospedeiro

Palavras-chaves: Análogos de purina, HGPRT, Modelagem molecular, *Schistosoma mansoni*.

ABSTRACT

Scenario: Schistosomiasis is a neglected disease that affects about 200 million people annually. Due to the emergence of new drug-resistant lines available on the current market, it is necessary to use computational techniques to discover new leading compounds. Enzymes of the parasite purine salvage pathway have been investigated as a possible therapeutic target. Thus, the aim of this work is to elucidate, through computational methods, candidates for schistosomicidal drugs of the class of purine synthetics, as well as to calculate the binding energies, in kcal/mol, of the analogues with the active site of the SmHGPRT of *Schistosoma mansoni*. **Objective:** Characterize new potential inhibitors of the enzyme HGPRT (Hypoxanthine-Guanine

Phosphoribosyltransferase). **Discussion:** Fludarabine stood out for its lowest estimated binding energy, presenting -9.68 kcal/mol, due to its similarity with IMP. Pentostatin presented an estimated binding energy of -8.68 kcal/mol, azathioprine obtained an estimated binding energy of -8.26 kcal/mol, mercaptopurine, the analogue with the smallest extension and molecular weight, presented an estimated complex energy of -5.88 kcal/mol. **Methods:** Research and development of public policies dedicated to neglected diseases, especially schistosomiasis, represent a crucial step in global public health and in the well-being of thousands of people living in situations of social vulnerability, at the mercy of the socioeconomic conditions of their country of origin. The *in silico* results were satisfactory, especially for fludarabine, pentostatin and azathioprine, which can be further refined based on the differences between human HGPRT and SmHGPRT, in an attempt to increase their potency on the parasite and reduce adverse effects on the host.

Keywords: HGPRT, Molecular modeling, Purine analogs, *Schistosoma mansoni*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da distribuição da esquistossomose no Brasil, 2009-2020, segundo faixa de positividade por município.....	6
Figura 2. Ciclo vicioso da pobreza	8
Figura 3. Fase pré-clínica e clínica de descoberta de fármacos.....	9
Figura 4. Fundamentos da técnica de <i>Structure Based Drug Design</i>	10
Figura 5. Via de recuperação das purinas.....	11
Figura 6. Esquema da reação catalisada pela enzima HGPRT.....	12
Figura 7. Interações entre estruturas secundárias.....	13
Figura 8. Estrutura cristalográfica da enzima SmHGPRT.....	13

Figura 9. Representação esquemática da estrutura “ <i>Doubly wound AB-sheet</i> ”	14
Figura 10. Comparação da HGPRT humana (laranja) e de <i>Schistosoma</i> (azul).....	14
Figura 11. Mecanismo de reação enzimática da HGPRT.....	16
Figura 12: Estrutura molecular da tubercidina.....	20
Figura 13. Núcleo purínico e seus análogos.....	21
Figura 14. Interações químicas estabelecidas entre IMP e HGPRT (5IPF).....	22
Figura 15. Interações pi do tipo sanduíche, <i>T-shaped</i> e <i>parallel-displaced</i> respectivamente.....	23
Figura 16. Interações químicas entre a fludarabina e SmHGPRT.....	23
Figura 17. Distância em Angstrom das ligações de hidrogênio e pi-pi stacking.....	24
Figura 18. Tipos de ligação de hidrogênio em função de sua localização em relação ao doador (D) e aceptor (A).	24
Figura 19. Interações químicas entre a pentostatina e SmHGPRT.....	25
Figura 20. Interações moleculares da azatioprina com SmHGPRT.....	26
Figura 21. Interações moleculares da azatioprina com SmHGPRT.	27
Figura 22. Interações químicas entre a mercaptopurina e SmHGPRT.....	27
Figura 23. Interações químicas da azatioprina modificada com SmHGPRT.....	28
Figura 24. Ligações de hidrogênio estabelecidas com os resíduos Thr 145 pelo átomo de oxigênio.....	29
Figura 25. Comparação da distância da ligação de hidrogênio mudança de oxigênio por fluor em anel imidazol de pentostatina.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas e parâmetros farmacocinéticos gerados pelo <i>software SwissADME</i>	19
---	----

LISTA DE ABREVIACOES

OMS – Organização Mundial da Saúde

MM – Modelagem Molecular

NCE – New Chemical Entity

SBDD – Design de Drogas Baseado na Estrutura

CADD – Design de Drogas Auxiliado por Computadores

HGPRT – Hipoxantina guanina fosforribosiltransferase

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

DNA - cido desoxirribonucleico

IC50 - Concentração inibitória

ATP – Trifosfato de Adenosina

PRPP – Fosforribosil

IMP – Monofosfato de inosina

GMP – Monofosfato de guanosina

PDB - Protein Data Bank

HBA – Aceptor de ligação de hidrogênio

HBD – Doador de ligação de hidrogênio

RTB - Ligações rotveis

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo de doenças causadas por diversos agentes etiológicos, como vírus, bactérias, protozoários e parasitas¹, frequentemente associadas a países em desenvolvimento e determinantes sociais, econômicos e ambientais, como populações de baixa renda e locais com pouco ou nenhum saneamento básico, baixo nível de escolaridade e higiene.²

A esquistossomose, popularmente conhecida como barriga d'água ou doença do caramujo, é uma doença causada por parasitas do gênero *Schistosoma*, composto por 6 representantes, dos quais se destacam o *S. mansoni*, *S. japonicum*, e *S. haematobium*, sendo o *S. mansoni* o único com distribuição nas Américas. O parasito foi, possivelmente, introduzido no Brasil devido ao intenso comércio de escravos e ao fluxo migratório que se iniciou em meados do século XVI.³

Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que pelo menos 251.4 milhões de pessoas precisaram do tratamento para a doença em 2021 e no Brasil se demonstra amplamente presente em várias partes do país, principalmente nas regiões norte e nordeste. A figura 1 demonstra a distribuição da esquistossomose no Brasil, abrangendo territórios do Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba, Sergipe e partes da região sudeste, principalmente em Minas Gerais e Espírito Santo, onde é considerada endêmica. Em outras regiões do país a distribuição é limitada e focal.^{3,4}

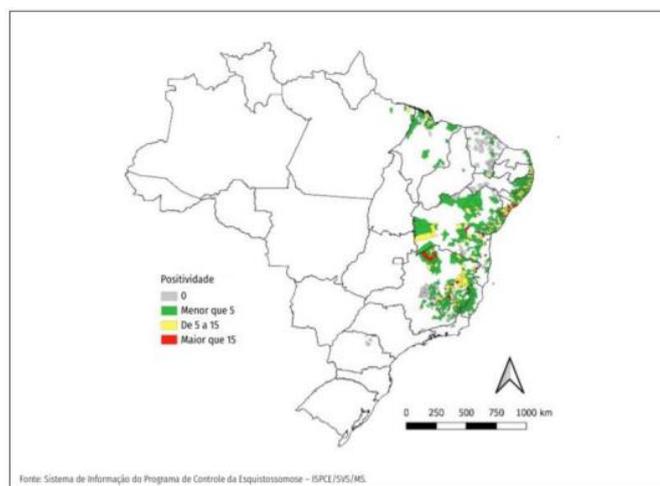


Figura 1. Mapa da distribuição da esquistossomose no Brasil, 2009-2020, segundo faixa de positividade por município.

Fonte: Brasil, 2014.³

O ciclo do *Schistosoma* se inicia após a contaminação de rios e lagos com fezes contendo ovos que irão desenvolver-se em miracídeos, os quais penetram no hospedeiro intermediário, o

caramujo *Biomphalaria glabrata*, onde se multiplicam e se desenvolvem em larvas chamadas cercárias. Entre 4 a 7 semanas após a penetração no caramujo, as cercárias alcançam a vida livre na água e são atraídas por peptídeos que possuem arginina terminal e ácidos graxos livres contidos na pele humana, ocorrendo a infecção normalmente nas beiras dos rios.⁵

Uma vez no corpo humano, as cercárias perdem suas caudas e se transformam em esquistossômulos. Essas formas jovens migram pela circulação sanguínea, atingem o coração e os pulmões e, em seguida, retornam ao coração, sendo lançadas para diferentes partes do organismo através das artérias. Os esquistossômulos se estabelecem principalmente no fígado, onde amadurecem e se tornam vermes adultos, após isso eles migram para o intestino, onde será realizada a postura dos ovos. Os ovos retidos nos tecidos, especialmente no fígado e nos intestinos, levam à formação de granulomas, causando inflamação e distúrbios gastrointestinais.⁶

A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, influenciadas por fatores como a cepa do parasito, carga parasitária, idade, estado nutricional e resposta imune do hospedeiro. A fase aguda da infecção é caracterizada por manifestações pruriginosas na pele, conhecida como dermatite cercariana, seguida por sintomas como febre, mal-estar, anorexia, náuseas, vômitos, entre outros.^{6,7} A forma crônica é resultado da inflamação eosinofílica e reação granulomatosa, levando à deposição de colágeno nos tecidos atingidos pelos vermes e ovos.

Ao longo da relação parasitária ocorrem alterações no metabolismo proteico e lipídico do hospedeiro, onde observa-se redução nos níveis de albumina, aumento das globulinas, causadas pelas alterações hepáticas, sendo essas alterações mais comuns em pacientes com a forma grave da doença. O metabolismo lipídico também é afetado nas formas graves da infecção, resultando em hipocalcemia, hipofosfatemia, lipidemia e redução na fração de éster do colesterol.⁸

Longos períodos e infecções de repetição podem levar à desnutrição, comprometendo a resposta imunológica do organismo, aumentando a suscetibilidade⁷ à infecção e agravando os sintomas da esquistossomose, comprometendo o desenvolvimento físico e cognitivo das pessoas afetadas.⁸ Tais circunstâncias desfavoráveis contribuem para um cenário de vulnerabilidade, estigmatização e piores desfechos de saúde dessa população.



Figura 2. Ciclo vicioso da pobreza.

Fonte: Elaborado pelo autor

Os fármacos disponíveis no mercado para o tratamento da esquistossomose (praziquantel e oxamniquina) são drogas desenvolvidas na década de 70, e que ainda são extensamente empregadas até hoje nas regiões afetadas, principalmente na África, onde tratamentos em massa são realizados todos os anos. Portanto, o surgimento de cepas resistentes torna-se um potencial perigo, demandando o desenvolvimento de novas terapias medicamentosas para o controle da doença.⁹

Um dos mais importantes avanços no planejamento e descoberta de novos fármacos tem sido a utilização da modelagem molecular (MM). Atualmente, a MM é uma ferramenta indispensável não somente no processo de descoberta de novos fármacos, mas também na otimização de protótipos já existentes, propondo-se novos usos para moléculas conhecidas e já estudadas para condições estabelecidas.¹⁰

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, conforme ilustrado na Figura 3, é dividido em duas grandes fases: (i) descoberta (também conhecida como pré-clínica ou pesquisa básica) e (ii) desenvolvimento (ou clínica).¹¹

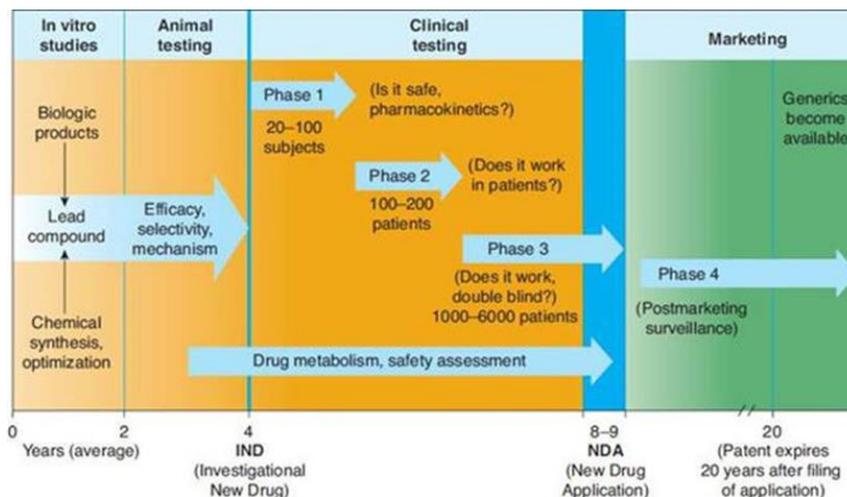


Figura 3. Fase pré-clínica e clínica de descoberta de fármacos.

Fonte: Lombardino, J. G., & Lowe, J. A. (2004).¹¹

Nos estágios iniciais da fase de descoberta, as pesquisas se concentram geralmente na identificação e otimização de moléculas pequenas capazes de representar novas entidades químicas (NCE, do inglês *New Chemical Entities*) com potencial de desenvolvimento de moléculas para condições específicas.¹²

O uso da conformação 3D das proteínas no desenvolvimento de novas moléculas biologicamente ativas é chamada de Design de Drogas Baseado na Estrutura (SBDD), uma estratégia bem sucedida e estabelecida usada pela academia e grandes indústrias farmacêuticas. Alguns requisitos são essenciais para os estudos de SBDD, como o entendimento dos aspectos espaciais e energéticos que afetam a afinidade da ligação do complexo proteína-receptor, sendo essa estratégia uma das principais aplicações do CADD (*Computer-Aided Drug Design*).¹³

Como exemplo notável dessa estratégia destaca-se o captopril, fármaco inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), que é considerado o primeiro medicamento descoberto utilizando um modelo estrutural de proteína e foi desenvolvido com base na estrutura 3D da carboxipeptidase A, enzima similar à ECA. A descoberta do captopril foi um marco na história do SBDD, apresentando uma potência significativamente maior ($IC_{50} = 23 \text{ nmol L}^{-1}$) em comparação com um inibidor desenvolvido anteriormente, o N-succinil-L-prolina ($IC_{50} = 330 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$).¹⁴

Outro exemplo importante na história do SBDD foi a descoberta da dorzolamida, no final dos anos 1990. A dorzolamida, um inibidor da enzima anidrase carbônica, é empregada no tratamento do glaucoma e foi o primeiro medicamento desenvolvido a partir da elucidação da estrutura 3D de seu alvo biológico.¹⁴

Os fundamentos da técnica de SBDD estão ilustrados na figura 4.

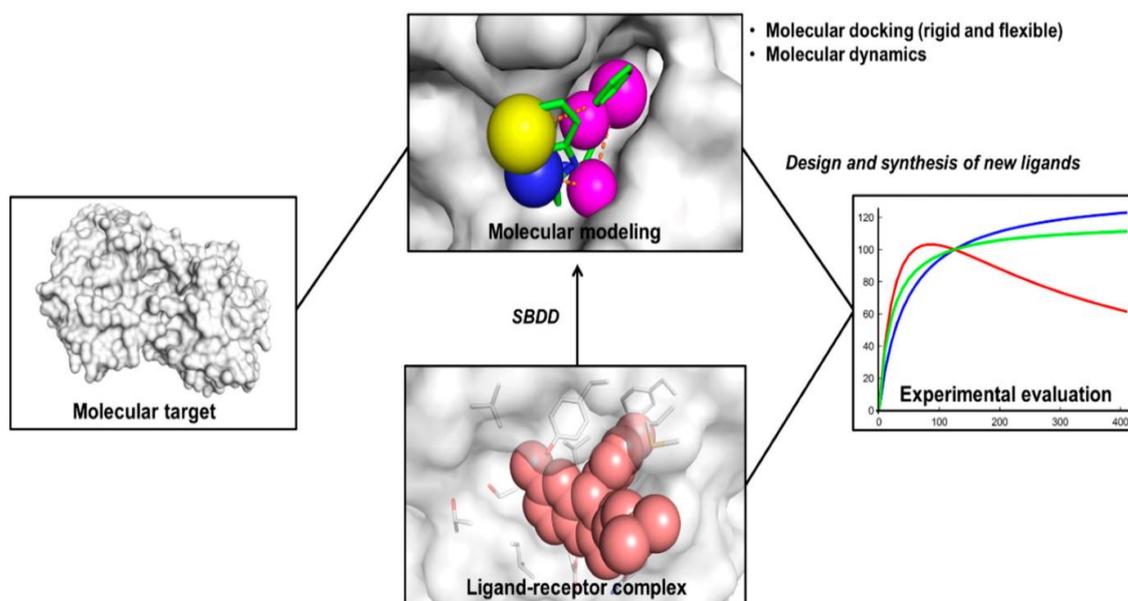


Figura 4. Fundamentos da técnica de Structure Based Drug Design (SBDD).

Fonte: Ferreira L.⁵

O uso de compostos inibidores enzimáticos é uma importante estratégia de intervenção terapêutica, como demonstrado em ambos casos supracitados, possibilitando a modulação do funcionamento de uma enzima chave em uma determinada via metabólica, tanto local quanto sistêmica.¹⁵

As purinas e seus metabólitos são biomoléculas de importância vital para todos os organismos vivos. Destacam-se os seus papéis na síntese de ácidos nucleicos, proteínas, como segundos mensageiros e para reações que necessitam de energia, encontrado na forma de trifosfato de adenosina (ATP).¹⁶

Essa via metabólica foi extensamente pesquisada, o que suscitou a síntese de moléculas que, desde 1953, com a descoberta da mercaptopurina, vem sendo empregadas em diversos esquemas de tratamento contra neoplasias, além de também haverem sido desenvolvidos diversos agentes virais análogos de nucleosídeos, dentre eles destaca-se o aciclovir e seus análogos, como ganciclovir, penciclovir.¹⁷

O grupo conhecido como antimetabólitos mimetiza antagonicamente o metabolismo usual das purinas devido a sua semelhança com os metabólitos endógenos, resultando na inibição de enzimas-chave envolvidas em suas vias de obtenção e eventualmente são introduzidos nas sequências de DNA, interferindo a sua continuidade e tendo ação citotóxica.¹⁸

Os nucleotídeos de purinas podem ser sintetizados pela via de novo, na qual dois aminoácidos, glicina e glutamina, gás carbônico (CO₂) e amônia (NH₃) são adicionados a

ribose presente no PRPP (fosforribosil pirofosfato) por meio de 6 enzimas e 10 reações para a síntese de nucleotídeos de purina.¹⁶

As purinas também podem ser obtidas pela via de recuperação, ilustrada na figura 5, onde organismos podem satisfazer a necessidade de núcleos purínicos em parte a partir de seu próprio metabolismo, recuperando os nucleosídeos remanescentes da degradação do DNA e RNA e por meio de fontes exógenas de purinas pré-formadas, no caso do parasito extraindo de seu hospedeiro. Devido ao reaproveitamento dos metabólitos intermediários esta se apresenta como uma alternativa menos custosa energeticamente.^{18,19}

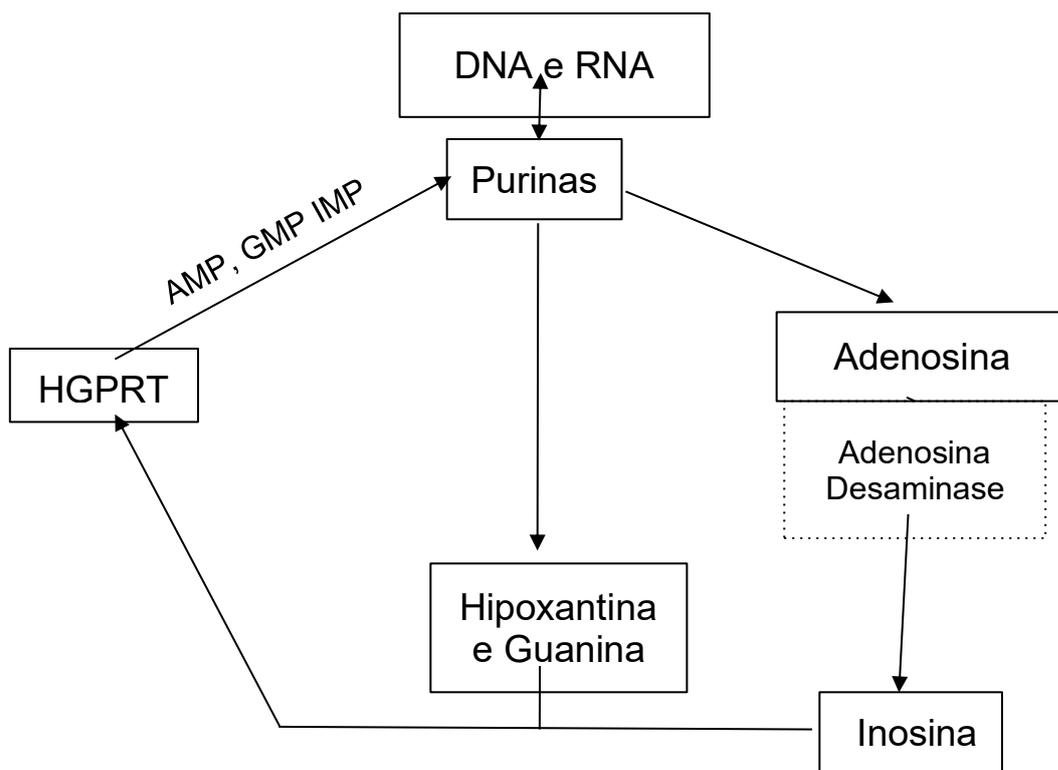


Figura 5. Via de recuperação das purinas.

Fonte: Elaborado pelo autor

Diversos estudos foram realizados por Senft *et. al* abordando o metabolismo de aminoácidos e de nucleotídeos pelo parasito, sendo constatado em 1973 que *Schistosoma mansoni* adultos incubados em culturas sem purinas tinham concentrações de ATP reduzidas, e não incorporavam resíduos radioativos de glicina em anéis purínicos, como esperado pela via de novo.¹⁹

A extensa capacidade de reprodução e oviposição destes parasitas reflete um grande aporte de nucleotídeos para realizar a replicação e conseqüentemente eficiência na incorporação

da adenina ao ATP. Destaca-se a presença da enzima adenosina desaminase e a elevada concentração da enzima adenina fosforribosiltransferase (PNP) e da hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT), enzimas chaves da via de salvamento das purinas.²⁰

A HGPRT catalisa a fosforribosilação reversível da hipoxantina e da guanina com o PRPP, resultando na formação de IMP e GMP como ilustrado na figura 6.

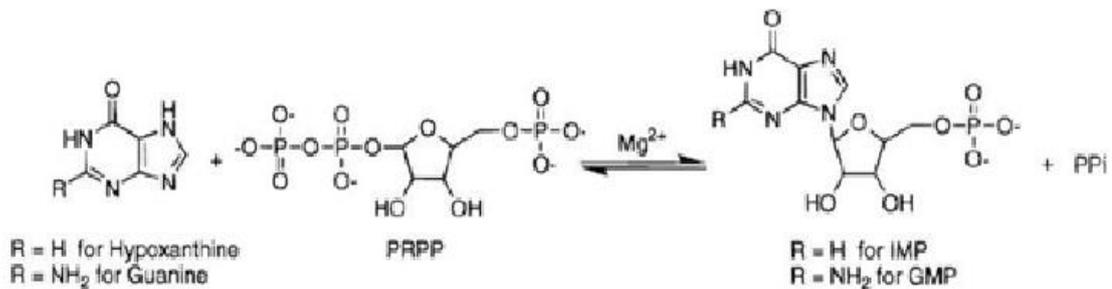


Figura 6. Esquema da reação catalisada pela enzima HGPRT.

Fonte: FOCIA et al. (1998)²⁴

Para realizar tal reação enzimática o *S. mansoni* carrega três genes homólogos para a síntese de HGPRT em seu genoma, entretanto apenas uma foi resolvida experimentalmente pelos trabalhos de Romanello em 2016, a isoforma Smp_103560. Ambas as isoformas restantes foram obtidas por meio de modelagem por homologia nos trabalhos de Lima e colaboradores em 2020, onde foram analisadas as moléculas do grupo dos acilonucleosídeos.²¹

O modelo foi obtido por meio de cristalografia de raio-X com 2.8 Å de resolução e depositada no PDB na forma de tetrâmero sob o código 5IPF. A proteína apresentada na figura 7 é composta por α -hélices e folhas β e interações entre estas estruturas secundárias com funções estruturais importantes, como as β -turns e β -hairpins ilustradas na figura 8.²⁰

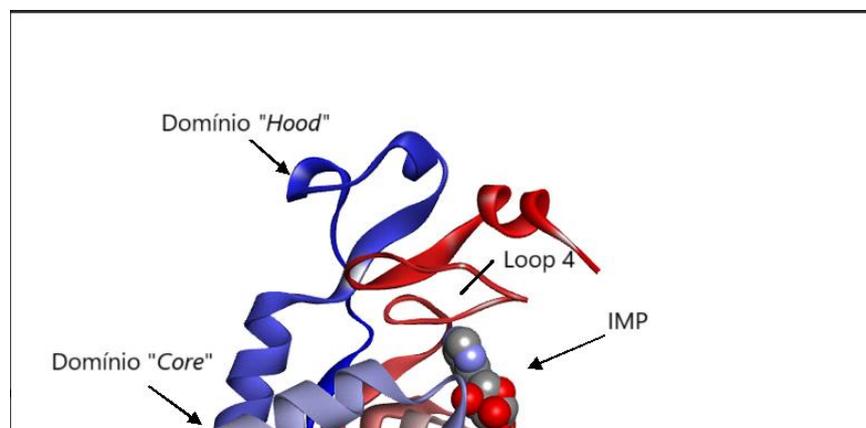


Figura 7. Estrutura cristalográfica da enzima SmHGPRT.

Fonte: Discovery Studio Visualizer

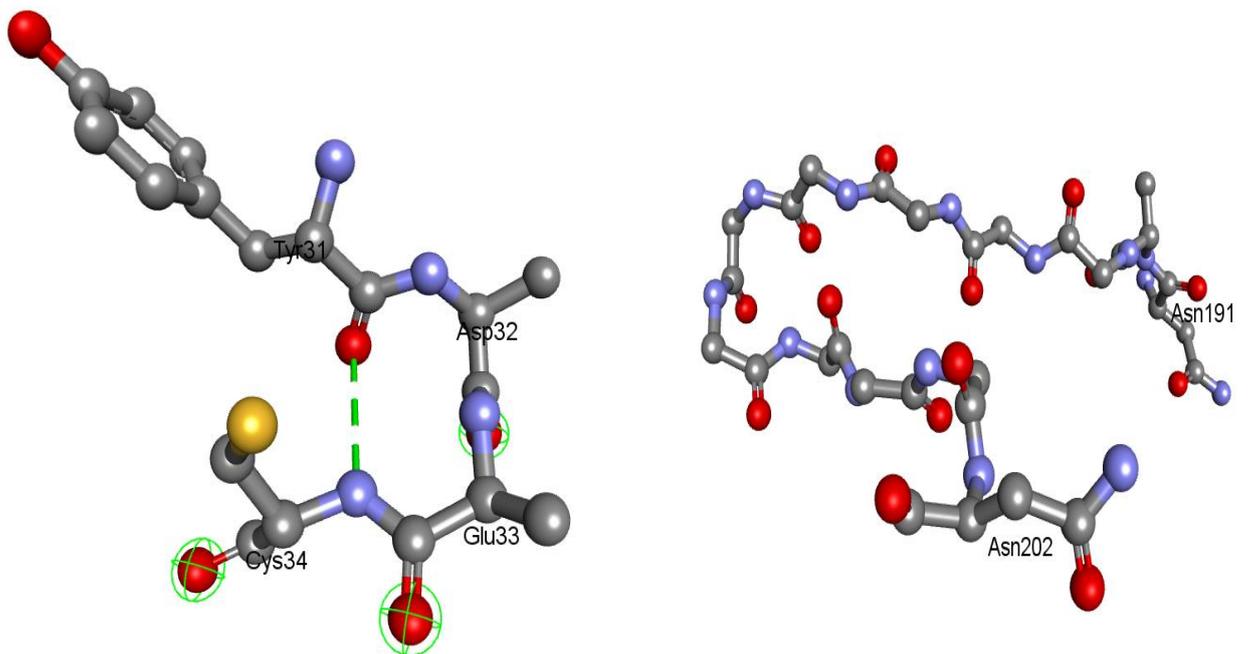


Figura 8. Interações entre estruturas secundárias. β -Turn localizada entre os resíduos Tyr31-Cys34 e β -Hairpin localizada no loop III entre os resíduos Asn191-Asn202 da SmHGPRT.

Fonte. Romanello, L.²⁰

A HGPRT pode ser dividida em dois domínios principais. O domínio denominado “Core” é composto por 4 folhas β (β_2 , β_3 , β_4 e β_5) paralelas e 3 alfa hélices (α_3 , α_4 e α_5) em seus flancos, caracterizando a interação “*doubly-wound α - β sheet*”.²² Um esquema simplificado destas estruturas está esquematizado na figura 9.



Figura 9. Representação esquemática da estrutura “Doubly wound AB-sheet”

Fonte: Demeler, B. University of Leathbridge. Biochemistry lecture 4000.

Sobreposto ao domínio “Core” encontra-se o domínio “Hood”, composto por 4 pequenas fitas β ($\beta 1$, $\beta 6$, $\beta 7$ e $\beta 8$) divididas em duas folhas, sendo uma paralela e outra antiparalela, além de 3 α -hélices ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 6$) e conexões de longos *loops*.

Entre os dois domínios se encontra o sítio ativo da proteína, sendo composto por 4 loops. O loop 1 é composto pelos resíduos 73-78, os resíduos Leu 74 e Lys 75 atuam em conjunto no momento da catálise, mudando sua conformação trans para cis no momento de pareamento com o PRPP. A Leu 74 está conservada entre diversas estruturas hospedadas no PDB, entre elas a de *Trypanosoma cruzi*, *Escherichia coli*, *Leishmania tarentolae* e *Trichomonas foetus*, apresentando papel funcional e estrutural importante.²³

O loop 2 é composto pelos resíduos 107-134, este fragmento apresenta ausência de densidade eletrônica dos resíduos 108 à 124 devido à flexibilidade do *loop*, demonstrada na figura 10, o qual varia entre conformação aberta, quando ocorre a entrada dos reagentes, e fechada onde as interações do PRPP com os íons de Mg^{2+} hidratados acontecem, posteriormente a proteína volta a sua forma aberta.²⁴

O loop 3 compreende os resíduos 141-146, qual apesar de ser um trecho de menor extensão, carrega papel importante no acoplamento do fosforribosil durante a catálise, estabelecendo diversas ligações de hidrogênio com os oxigênios presentes no substrato. O resíduo Asp141 é invariável em todas as HGPRT depositadas no PDB.²⁴

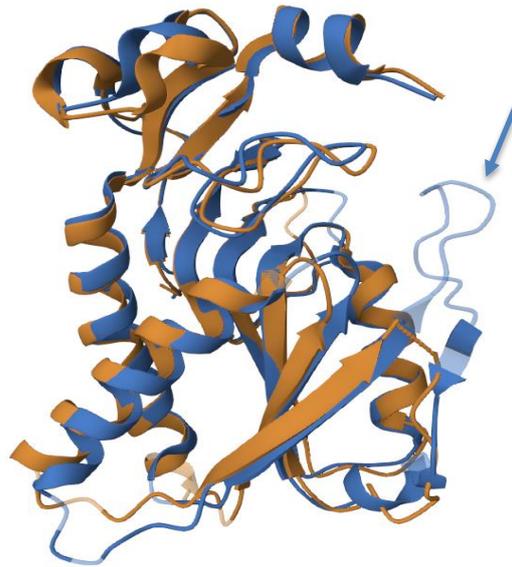


Figura 10. Comparação da HGPRT humana (laranja) e de *Schistosoma* (azul). Destaca-se o loop 2 não complementar, enfatizando seu caráter flexível em diferentes momentos da catálise

Fonte: PDB – <https://www.rcsb.org/alignment>

O loop 4 está localizado no domínio Hood, abrangendo os resíduos 190-211, destacando-se o papel do resíduo aromático Phe193. Como demonstrado na figura 11, este loop estabelece ligações importantes do tipo π - π stacking, mantendo o anel purínico do IMP ancorado para que o PRPP seja introduzido na purina, sendo liberado o PPI-Mg e posteriormente o GMP-Mg ou IMP-Mg.²⁴

O mecanismo enzimático da SmHGPRT foi proposto por Heroux et. al²⁶ baseado na HGPRT de *Toxoplasma gondii* e elaborado a partir da análise conjunta de estruturas cristalizadas em forma apo e na presença dos substratos guanina, hipoxantina e PRPP, e também dos produtos, GMP, IMP e PPI e está descrito na figura 11.

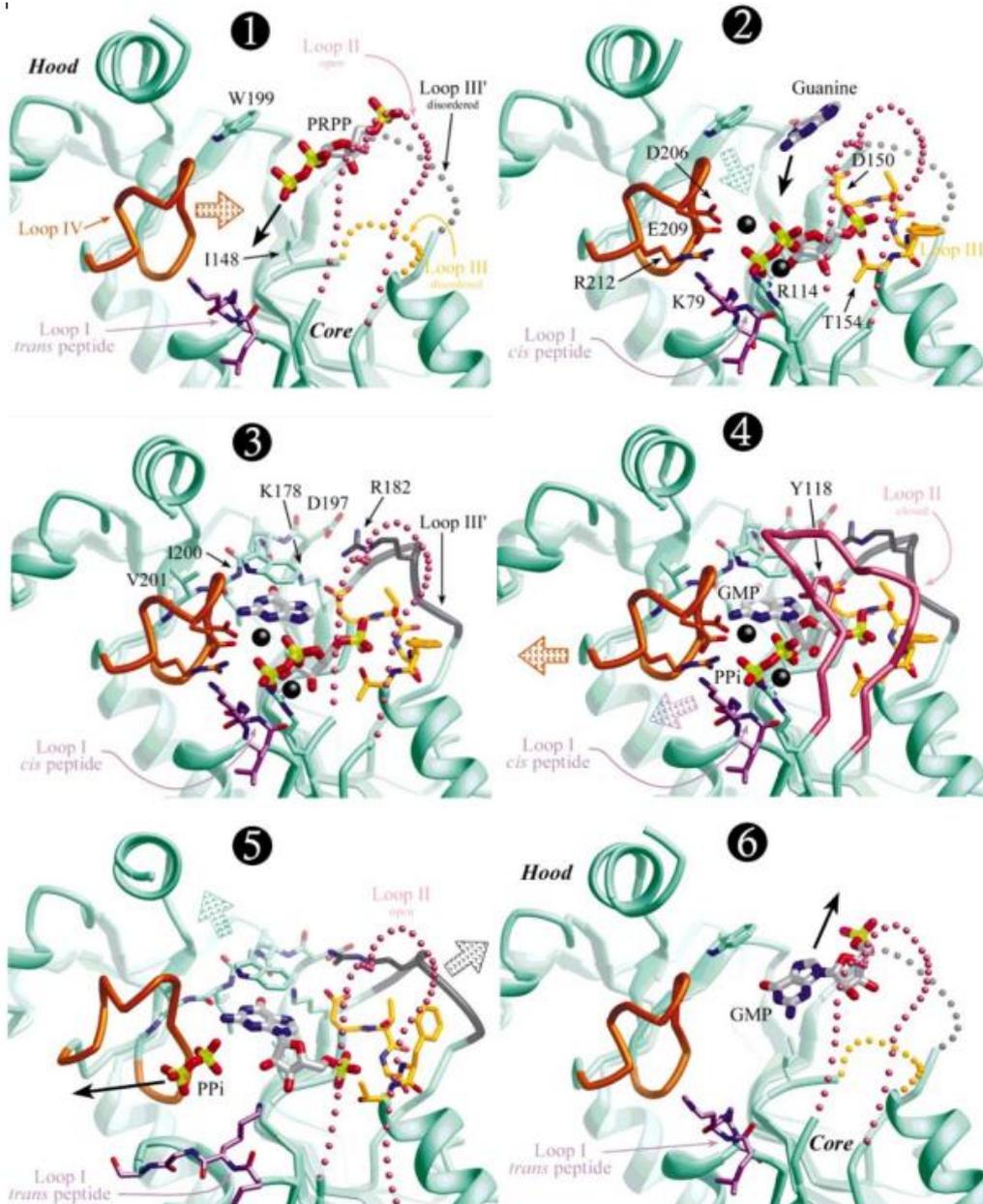


Figura 11. Mecanismo de reação enzimática da HGPRT. 1-Apoenzima entrando no sítio ativo. Os loops II, III e III' em conformação aberta. 2- Complexo PRPP-Mligado e Lys 79 (Lys74) adota conformação cis peptídeo. As interações do PPi do PRPP, loop I e loop IV aproximam o domínio Hood do domínio Core. Loop III ordenado ao redor do 5'fosfato e guanina entra no sítio ativo. 3-Bolsão de ligação à guanina é fechado e ordenado ao redor da base. Loop III fechado permite que o loop III' se feche colocando Arg 182 entre Asp 150 e 197 completando a ligação dos domínios hood e core. 4- Loop II se fecha colocando o resíduo Tyr 118 em posição de ligação de hidrogênio com o fosfato 5' permitindo a transferência do fosforribosil. 5- Loop I e IV são abertos e PPi sai do sítio ativo. Lys 79 (Lys 74) do loop I retorna a configuração trans e o loop II é aberto. 6- Loop III' e III se acharem e liberam GMP e HGPRT retorna a forma apoenzima.

Fonte: Heroux et. al²⁵.

Diante dessas informações, o presente trabalho pretende explorar a via de salvação das purinas, caracterizando novos possíveis inibidores da enzima HGPRT, com o intuito de desenvolver novas opções terapêuticas para o controle do parasita *Schistosoma mansoni*. Para tal, foi realizado o *docking* molecular dos fármacos análogos de purinas frente a hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase do *Schistosoma mansoni* (SmHGPRT), bem como foram estimadas as energias de ligação, em kcal/mol, dos análogos com o sítio ativo da proteína, visando uma melhor compreensão das interações intermoleculares envolvidas.

MÉTODOS

O processo de docagem envolve quatro etapas básicas: (1) Preparo da estrutura alvo; (2) Escolha dos ligantes; (3) Predição da conformação, posição, orientação do ligante dentro dos sítios e (4) Avaliação da afinidade de ligação.

No presente trabalho a proteína de escolha foi a SmHGPRT, com 2.8 Å de resolução, a qual está catalogada sob o código 5IPF no *Protein Data Bank (PDB)*. A proteína foi tratada manualmente lançando-se mão do software *Discovery Studio Visualizer*, no qual foram eliminadas moléculas de água e o ligante IMP, já presentes na macromolécula 5IPF no PDB.

Os ligantes 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, fludarabina e pentostatina foram obtidos a partir do banco de dados *PubChem* em formato *.SDF (structured data files)*, e convertido em *.PDB* pelo software *OpenBabel 3.1.1*.

Foram propostas modificações moleculares na pentostatina e azatioprina, adicionando-se um grupo fluor na porção ribosídica da pentostatina e um grupo amina no anel imidazol da azatioprina.

Foi realizada análise *in silico* das propriedades físico-químicas utilizando o software SwissADME, seguindo os principais parâmetros da Regra dos 5 de Lipinski, sendo estes: peso molecular < 500, $\log P < 5$, 5 (cinco) doadores de ligação de hidrogênio (*HBD*) e 10 (dez) aceptores (*HBA*). Além disso a área de superfície polar (*TPSA*) e os *scores* de biodisponibilidade foram calculados.

O procedimento de *docking* foi performedo pelo software AutoDockTools 1.5.6, com a área de docagem molecular (*grid box*) definida, utilizando as coordenadas: $X = -8.999 \text{ \AA}$; $Y = -7.503 \text{ \AA}$; e $Z = 6.361 \text{ \AA}$, com dimensões de $40 \times 40 \times 48 \text{ \AA}$. Nos parâmetros do *Genetic algorithm* foram obtidas 20 poses para cada ligante, utilizando *Population Size* de 300, os demais parâmetros não foram alterados.

Os complexos receptor-ligante foram ranqueados em ordem decrescente de energia e os de menor valor foram selecionados para análise das interações moleculares no software *Discovery Studio Visualizer*.

DISCUSSÃO

O docking molecular é uma técnica computacional que visa estimar as energias de ligação (kcal/mol) de uma ou mais moléculas (ligantes) com possíveis sítios ativos de um receptor (proteína) por meio de *scoring functions*, ou seja, equações complexas que atribuem valores às interações químicas e orientações espaciais, rotação das ligações químicas, e outros parâmetros, ranqueando os complexos mais favoráveis.¹⁴

A primeira evidência da utilização de análogos de purinas contra os parasitas do gênero *Schistosoma* na literatura científica foi observada por Jaffe e colaboradores em 1971, onde a tubercidina, ilustrada na figura 12, era previamente introduzida em hemácias e demonstrou ser ingerida e incorporada no DNA e RNA a partir a concentração de $.10^{-7}M$, causando separação prematura dos vermes adultos, distúrbios de motilidade e inibição da oviposição, porém também causando toxicidade ao hospedeiro.²⁶

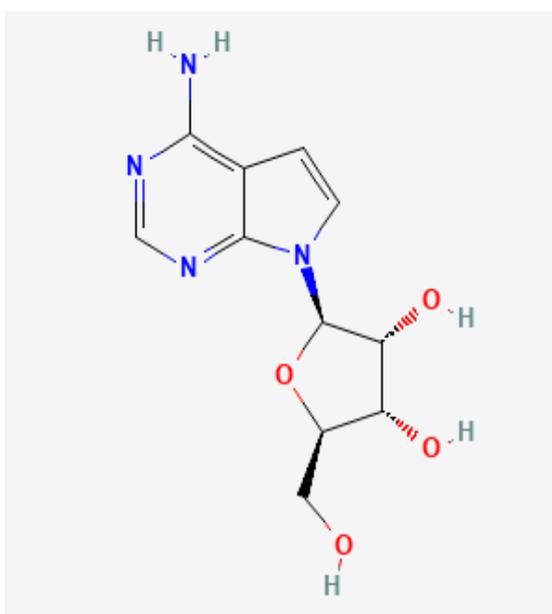


Figura 12. Estrutura molecular da tubercidina.

Fonte: Elaborado pelo autor

Desde então, diversos análogos de purinas foram desenvolvidos e aprovados pelas agências reguladoras, tendo sido introduzidos em diversos esquemas de tratamento de neoplasias, sendo avaliadas quanto ao mecanismo de ação e suas particularidades, a relação estrutura-atividade do grupo, efeitos colaterais e seus perfis de segurança. A figura 13 compila os análogos naturais (1-4) e os sintéticos (5-9).

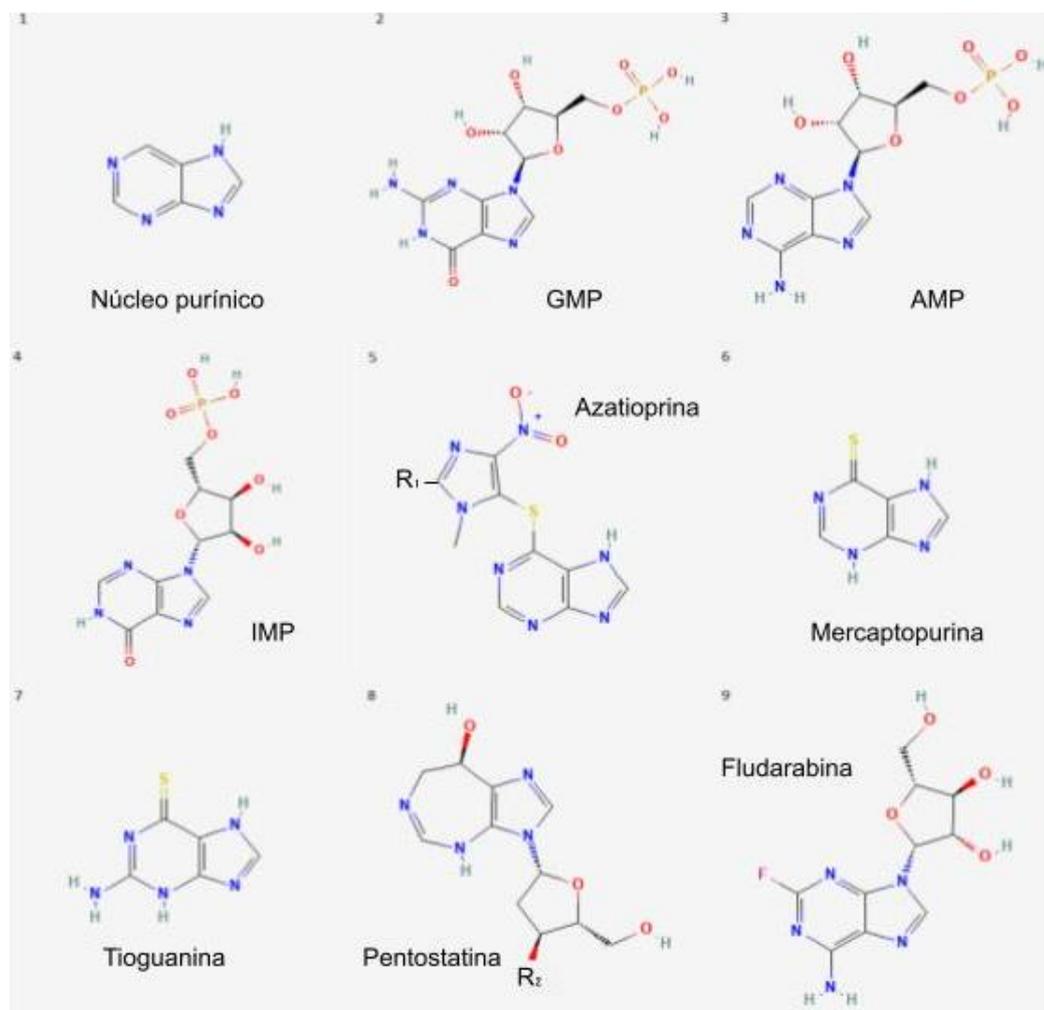


Figura 13. Núcleo purínico e seus análogos. Azatioprina: $R_1=X$;
Azatioprina modificada $R_1=NH_2$; Pentostatina: $R_2=OH$; Pentostatina modificada $R_2=F$

Fonte: Elaborado pelo autor

Destaca-se a semelhança da mercaptopurina e tioguanina constituindo bioisómeros monossustituídos do núcleo purínico. A azatioprina (5) é um análogo tiopurínico adicionado de um anel imidazol contendo uma amina terciária e um grupo metila. A pentostatina se caracteriza pela substituição do anel pirimidínico por um anel 1,2 diazepina. A fludarabina se caracteriza pela presença do átomo eletronegativo de flúor em N1.

As características físico-químicas dos análogos de purina estudados neste trabalho estão listadas na tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas e parâmetros farmacocinéticos gerados pelo *software SwissADME*.

Compostos	MM (g mol ⁻¹)	MLogP	LogS	HBA/HB D/RTB	TPSA (Å)	Bioav. Score
IMP	348.21	-0.97	-0,17	10/5/4	189.83	0.11
Fludarabina	285,23	0,79	-1,31	8/4/2	139,54	0,55
Pentostatina	268,27	0,72	-0,25	6/4/2	112,13	0,55
Tioguanina	167,19	0,14	-1,44	2/3/0	115,47	0,55
Mercaptopurina	152,18	0,44	-1,46	2/2/0	89,45	0,55
Azatioprina	277,26	0,34	-1,97	6/1/3	143,40	0,55
Azatioprina+NH ₂	291.29	1.36	-2.77	5/2/3	156.53	0.55
Pentostatina+F	284,29	0.95	-0.69	6/3/3	91.90	0.55

Análises comparativas entre a sequência peptídica de SmHGPRT-1 e todas as outras HGPRs depositadas no PDB indicaram que dez resíduos (Leu74, Gly76, Leu84, Glu140, Asp141, Thr148, Lys172, Gly196, Asp200 e Arg206) estão conservados entre elas, estando

cinco deles (Glu140, Asp 200, Asp141, Thr148, Lys172) localizados no sítio ativo 1 da proteína. (ROMANELLO et al, 2019).

A análise das interações intermoleculares compartilhadas entre o ligante IMP e a enzima, demonstrada na figura 14, é de suma importância para o desenvolvimento de novos inibidores propostos para a enzima. Observam-se seis ligações de hidrogênio em seu grupo fosfato com os resíduos do loop 3, Asp144 a Thr148, seguida de uma em sua porção ribosídica e outra na carbonila localizada em C4 no núcleo purínico.

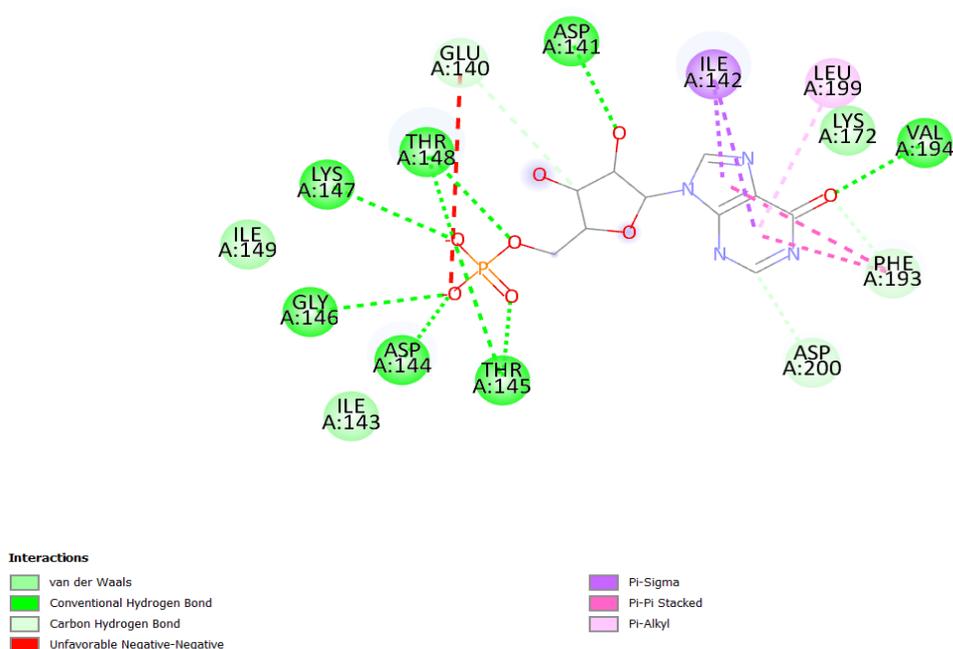


Figura 14. Forças intermoleculares estabelecidas entre IMP e HGPRT (5IPF)

Fonte: Elaborado pelo autor no software Discovery Studio Visualizer

As interações do tipo π são geradas a partir dos orbitais moleculares p e exercem papel fundamental nas interações que fixam a porção purínica da inosina e guanina no bolsão hidrofóbico criado pelo loop 2, 3 e 4, interagindo com a cadeia lateral fenólica do aminoácido Phe193 por meio de empilhamento Pi-Pi stacked do tipo parallel-displaced, contribuindo para a correta orientação e seguimento do mecanismo da HGPRT.

A figura 15 ilustra os principais tipos de interações exercidas pelos sistemas aromáticos.

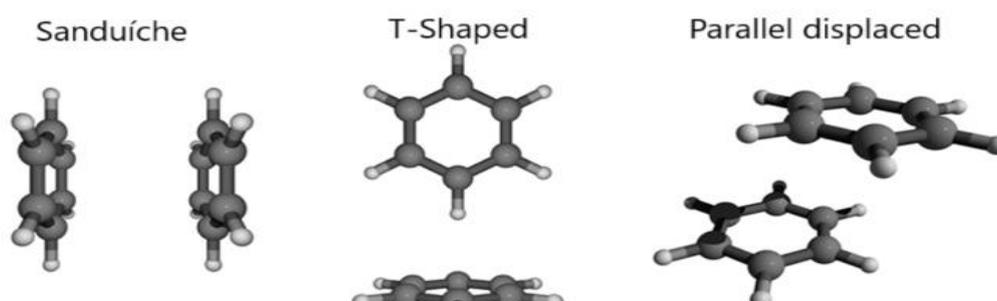


Figura 15. Interações pi do tipo sanduiche, T-shaped e parallel-displaced respectivamente.

Fonte: Sinnokrot MO, Valeev EF, Sherrill CD. Estimates of the Ab Initio Limit for π - π Interactions: The Benzene Dimer. Journal of the American Chemical Society.

A fludarabina, ilustrada na imagem 16, se destacou pelo menor resultado estimado de energia de ligação, apresentando -9.68 kcal/mol, possivelmente devido a sua semelhança estrutural com o IMP. Quatro ligações de hidrogênio são comuns as constatadas no ligante natural IMP, são elas Asp144, Gly146, Lys147 e Thr148 em seu grupo fosfato, além de três ligações de hidrogênio em sua porção purínica, sendo uma compartilhada com o resíduo Asp200 e as demais localizadas no nitrogênio em C6 com o resíduo Val194.

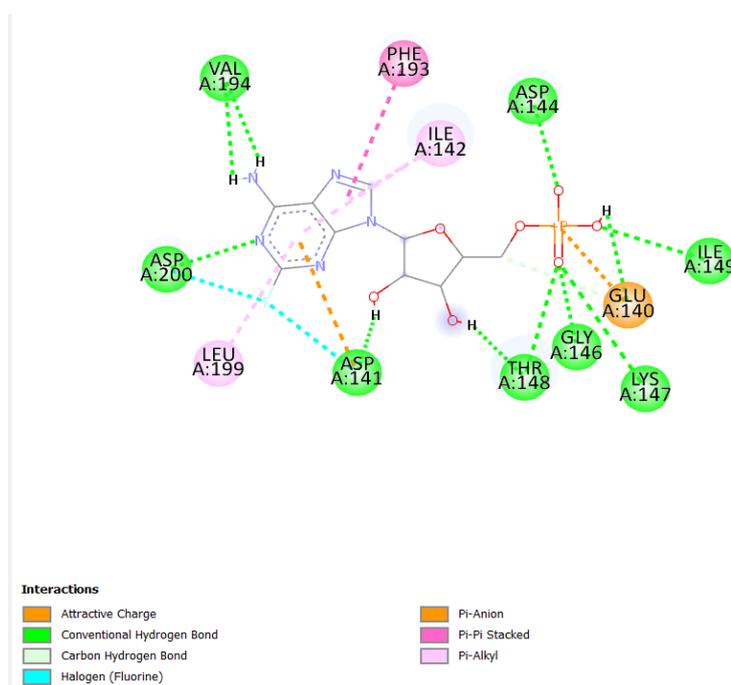


Figura 16. Forças intermoleculares estabelecidas entre a fludarabina e SmHGPRT.

Fonte: Elaborado pelo autor no software Discovery Studio Visualizer.

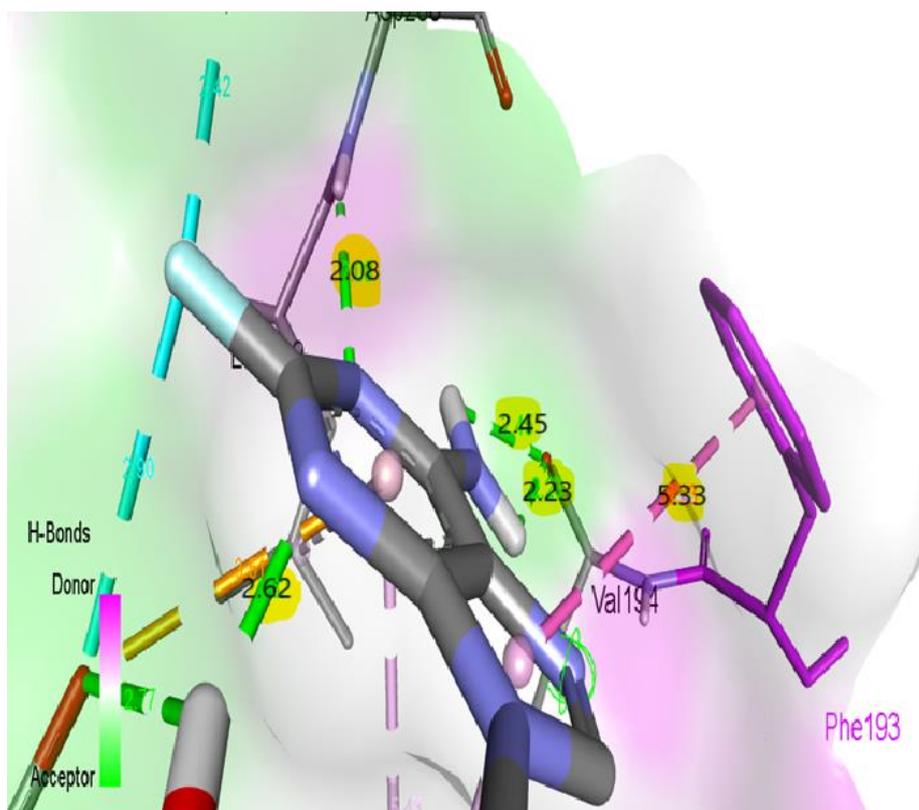


Figura 17. Distância em Angström das ligações de hidrogênio estabelecidas pelos resíduos Asp200, Asp141 e Val194 e interação pi-pi stacking entre o núcleo purínico da fludarabina com o resíduo aromático Phe193.

Fonte: Elaborado pelo autor no software Discovery Studio Visualizer

Duas ligações do tipo pi entre Ile142 e Leu199 dão suporte a ambos anéis do núcleo purínico, adicionado de uma interação pi-anion com Asp141 na porção benzênica colaboram com o ancoramento em conjunto com o resíduo Phe193, destacado em roxo na figura 17, que estabelece interações pi-pi *stacked*. A presença do flúor no anel purínico como acceptor possibilitou a formação de duas ligações de hidrogênio em conjunto com ligações pi, somando consideravelmente para o resultado apresentado.

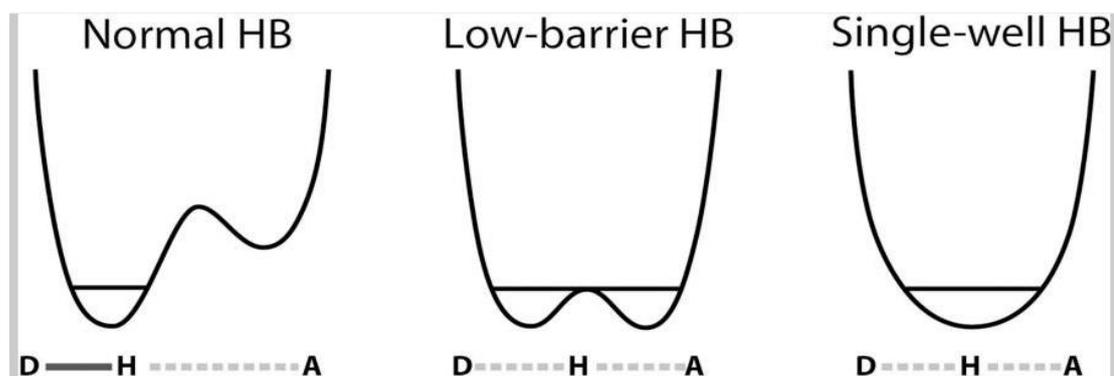


Figura 18. Tipos de ligação de hidrogênio em função de sua localização em relação ao doador (D) e aceptor (A).

Fonte: M. Trent. Low barrier hydrogen bonds in protein structure and function

Como observado na figura 18, ligações de hidrogênio normais exibem uma deslocalização eletrônica entre o doador (D) e aceptor (A) da ligação e medem em torno de 2.8-3.0 Å. As ligações de hidrogênio de baixa barreira, assim cunhadas por Cleland em 1993 exibem uma distribuição mais igualitária da densidade eletrônica entre doador e aceptor, medindo normalmente 2.5 Å ou menos e apresentando maior contribuição energética, principalmente em estados de transição enzimática.²⁸

A pentostatina apresentou energia estimada de -8,68 kcal/mol. Este resultado advém de quatro ligações de hidrogênio com os resíduos Asp200, Thr145, Gly146 e Asp144, além de interações π -alkyl com Leu199 e Ile142, interações π -anion com Asp 141 e interações pi-pi-stacked estabelecidas entre o anel 1,2-diazepina e a Phe193.

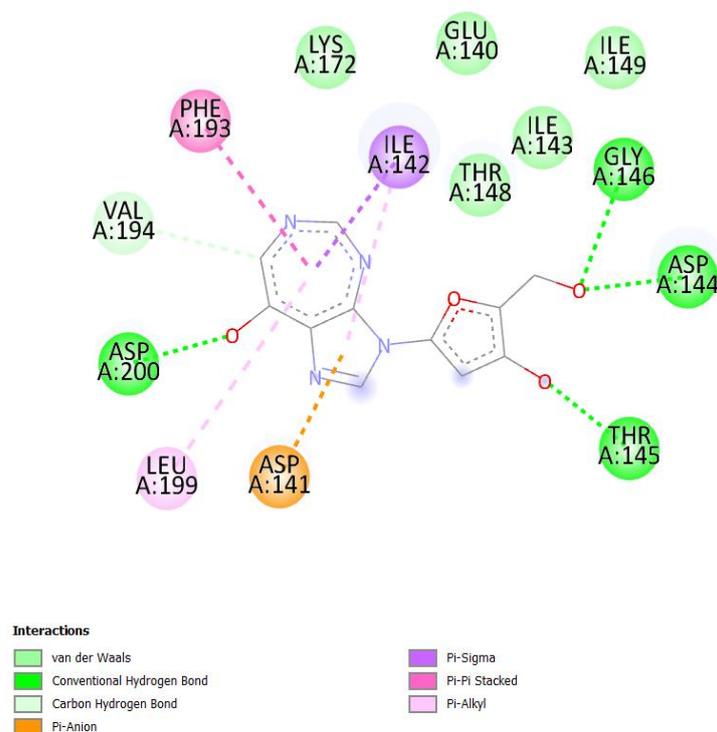


Figura 19. Forças intermoleculares estabelecidas entre a pentostatina e SmHGPRT.

Fonte: Elaborado pelo autor no software Discovery Studio Visualizer

A azatioprina, ilustrada na figura 20, obteve energia de ligação estimada de -8,26 kcal/mol, estabelecendo duas ligações de hidrogênio com a amina localizada na cadeia lateral da Lys172, somadas a mais quatro ligações de hidrogênio dos resíduos Thr148 e Lys147 em N1 e Glu140 e Ile142 em N9 do anel purínico.

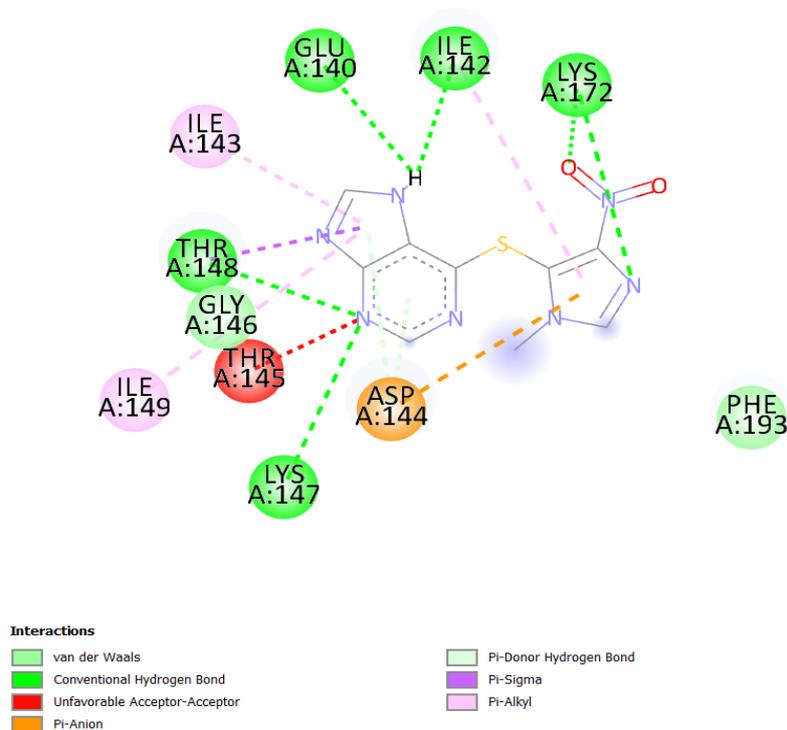


Figura 20. Interações intermoleculares estabelecidas entre a azatioprina e SmHGPRT.

Fonte: Elaborado pelo autor no software Discovery Studio Visualizer

Interações pi-alkyl estabelecidas entre as cadeias laterais das Ile142, Ile143, Ile149 e pi-sigma no resíduo Thr148 assumiram o papel de ancoramento do anel purínico e imidazólico, onde o resíduo e Asp144 interage por meio de ligação pi-anion. a Phe193 e Gly146 diferentemente dos outros complexos interagem por meio de forças de van der Waals.

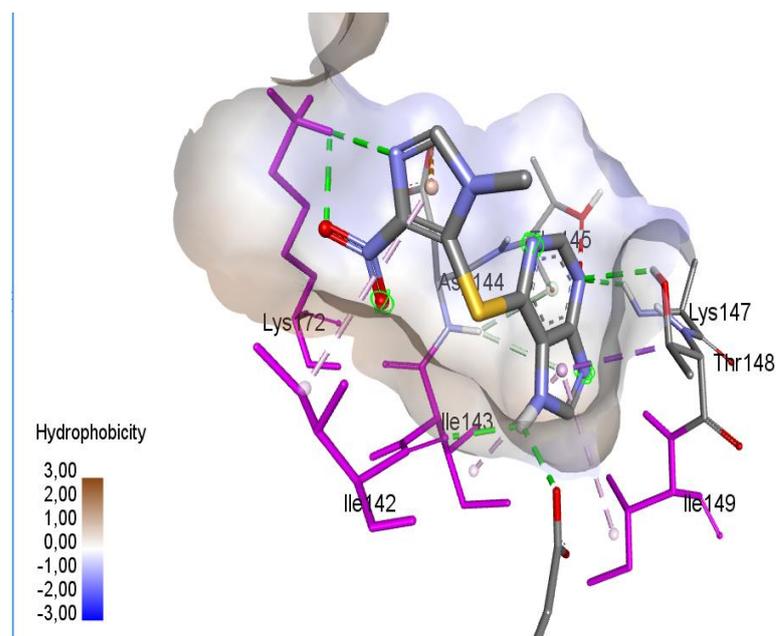


Figura 21. Interações moleculares da azatioprina com SmHGPRT. Os resíduos coloridos de rosa indicam aqueles que possuem cadeia lateral alifática e fazem parte do bolsão hidrofóbico.

Fonte: Elaborado pelo autor no software Discovery Studio Visualizer

Já a mercaptopurina, exposta na figura 22, sendo o análogo de menor extensão e peso molecular, apresentou energia estimada do complexo de -5.88 kcal/mol, estabelecendo

LYS
A:147



apenas três ligações de hidrogênio, o resíduo Ile142 participa de duas destas, acoplando-se na porção C4 e N9 do núcleo purínico, onde a Glu140 também interage da mesma forma.

Figura 22. Forças intermoleculares estabelecidas entre a mercaptopurina e SmHGPRT.

Fonte: Elaborado pelo autor no software Discovery Studio Visualizer

O anel imidazol estabelece três ligações do tipo pi, das do tipo Alquil com as Ile142 e Ile149 presentes no bolsão hidrofóbico explicitado anteriormente.

O hidrogênio contido na estrutura da Asp144 estabelece duas ligações de hidrogênio pi-Donor com o núcleo purínico. Lys147 e Gly146 interagiram por meio de ligações de van der Waals.

Em virtude da promissora energia de ligação dos análogos não fosfatados de purina pentostatina e da azatioprina foram propostas duas modificações a partir de suas estruturas. Foi introduzido uma amina terciária entre os nitrogênios do anel imidazol na azatioprina como demonstrado na representação 2D da figura 13.

O saldo da modificação foi a adição de mais uma ligação forte de hidrogênio com o resíduo Asp200, resíduo conservado no sítio ativo de todas as HGPRT depositadas no PDB.

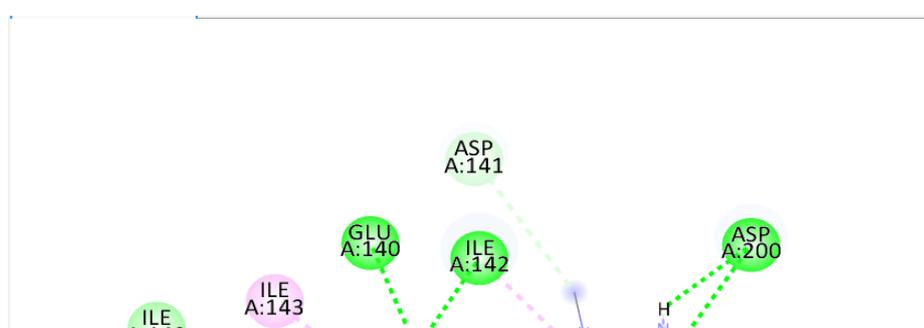


Figura 23. Forças intermoleculares estabelecidas entre a azatioprina modificada e SmHGPRT.

Fonte: Elaborado pelo autor no software Discovery Studio Visualizer

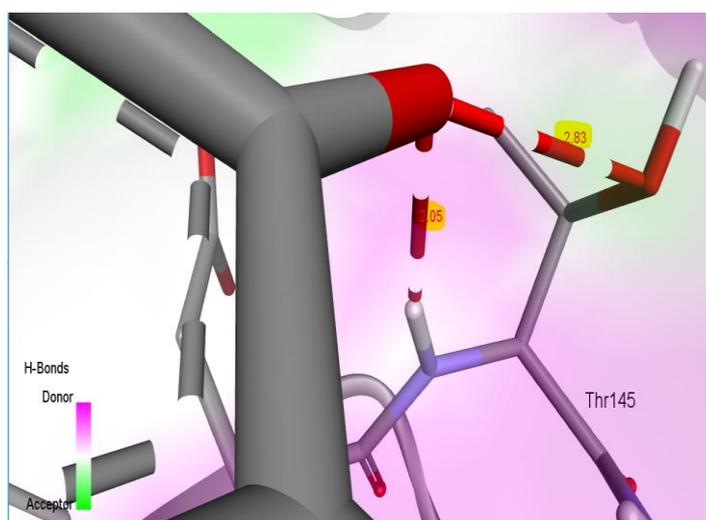


Figura 24. Ligações de hidrogênio estabelecidas com o resíduo Thr145 pelo átomo de oxigênio.

Fonte: Elaborado pelo autor no software Discovery Studio Visualizer

Quanto ao ligante pentostatina o átomo de oxigênio do anel imidazol foi substituído por um átomo de flúor. A partir de tais modificações foi observada não a mudança de interação entre os aminoácidos, mas sim a quantidade e distância das ligações de hidrogênio.

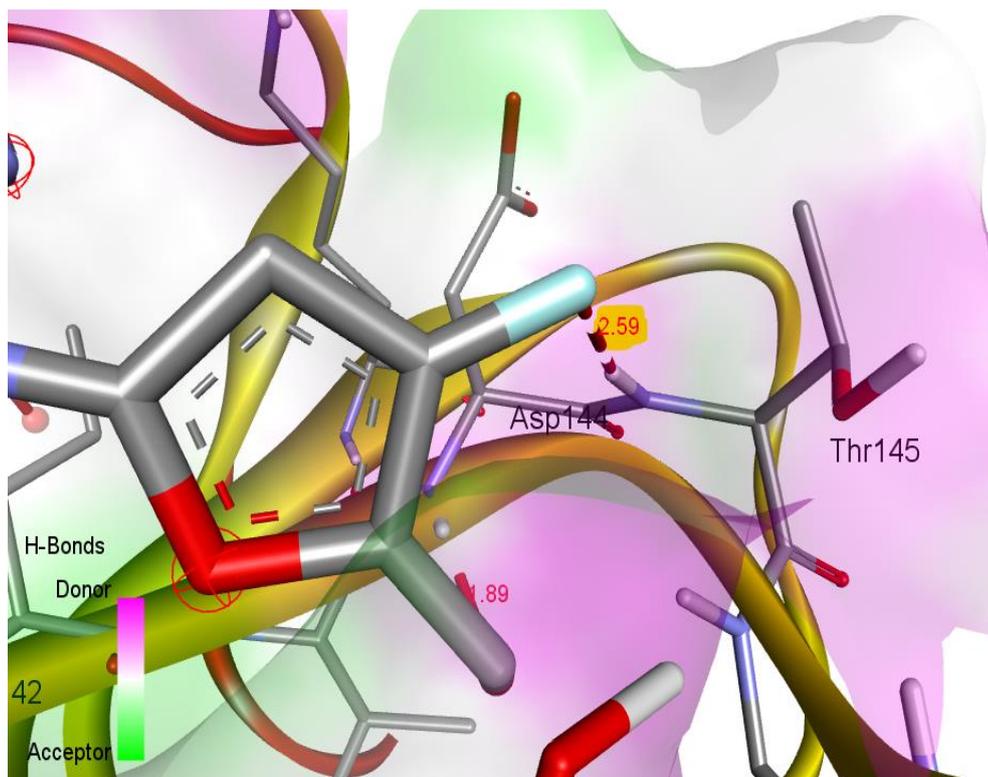


Figura 25. Ligação de hidrogênio formada pós modificação do radical hidroxila (OH) pelo radical flúor no anel imidazol da pentostatina.

Fonte: Elaborado pelo autor no software Discovery Studio Visualizer

Pode-se perceber a presença de duas interações na pentostatina com oxigênio devido a natureza bivalente, necessitando realizar duas ligações para se encontrar estável, ao passo que com o flúor apresenta apenas uma, devido a sua monovalência.

CONCLUSÃO

A pesquisa e o desenvolvimento de políticas públicas dedicados as doenças negligenciadas, em especial à esquistossomose, representam um passo crucial na saúde pública global e no bem-estar de milhares de pessoas que vivem em situação de vulnerabilidade social, a mercê das condições socioeconômicas de seu país de origem.

Em virtude do aparecimento de parasitos resistentes ao fármaco praziquantel relatados na literatura desde 1994, nosso trabalho se propôs a avaliar as características físico-químicas e o potencial inibitório dos análogos de purinas sobre a SmHGPRT.

Os resultados *in silico* apresentaram caráter satisfatório, principalmente da fludarabina, pentostatina e azatioprina, que podem ser posteriormente refinados baseado nas diferenças entre a HGPRT humana e a SmHGPRT, na tentativa de aumentar sua potência sob o parasito e reduzir os efeitos adversos sobre o hospedeiro.

REFERÊNCIAS

1. Organização Mundial da Saúde. Doenças tropicais negligenciadas [Internet] Geneva; 2021[cited 2023 May 23] Disponível em:<https://www.emro.who.int/health-topics/tropical-diseases/>.
2. CARVALHO, AI. Determinantes sociais, econômicos e ambientais da saúde. In FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. A saúde no Brasil em 2030 - prospecção estratégica do sistema de saúde brasileiro: população e perfil sanitário [online]. Rio de Janeiro: Fiocruz/Ipea/Ministério da Saúde/Secretaria de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, 2013. Vol. 2. pp. 19-38. ISBN 978-85-8110-016-6. Available from SciELO Books
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 144 p. : il. Título da 3ª edição: Vigilância e Controle da Esquistossomose: diretrizes técnicas ISBN 978-85-334-2152-3

- 3.OMS. Organização mundial de saúde. 2022. Available from: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html
5. Ferreira MU. Parasitologia Contemporânea. (2nd edição). [Digite o Local da Editora]: Grupo GEN; 2020.
- 6 Pordeus Luciana Cavalcanti, Aguiar Lucilene Rafael, Quinino Louisiana Regadas de Macedo, Barbosa Constança Simões. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. *Epidemiol. Serv. Saúde* [Internet]. 2008 Set [citado 2024 Set 21]; 17(3): 163-175. Disponível em: [http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742008000300002](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742008000300002&lng=pt). <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742008000300002>.
- 7 Santos, I.G.A. et al. Aspectos relacionados com a positividade para a esquistossomose: estudo transversal em área de baixa prevalência em Alagoas. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* [online]. 2020. v. 30, n. 2, e2020520. (Santos, I.G.A. et al.2020)
- 8 CUPPARI, Lilian. Nutrição Clínica no Adulto. Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar.
- 9 Danso-Appiah A, Olliaro PL, Donegan S, Sinclair D, Utzinger J. Drugs for treating *Schistosoma mansoni* infection. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, Issue 2. Art. No.: CD000528. DOI: 10.1002/14651858.CD000528.pub2
- 10 Patrick GL. An introduction to medicinal chemistry. 5th ed. Editorial: Oxford: Oxford University Press; 2013.
- 11 Lombardino, J. G., & Lowe, J. A. (2004). The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 3, Issue 10, pp. 853–862). <https://doi.org/10.1038/nrd1523>
- 12 STROVEL, J. et al. Early Drug Discovery and Development Guidelines: For Academic Researchers, Collaborators, and Start-up Companies. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92015/#:~:text=New%20Chemical%20Entity%20\(NCE\)%20](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92015/#:~:text=New%20Chemical%20Entity%20(NCE)%20)>. Acesso em: 22 set. 2024.
- 13 Andricopulo A, Salum L, Abraham D. Structure-Based Drug Design Strategies in Medicinal Chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2009 Jun 1;9(9):771–90.
- 14 Piccirillo E, Amaral A. BUSCA VIRTUAL DE COMPOSTOS BIOATIVOS: CONCEITOS E APLICAÇÕES. *Química Nova*. 2018;41.
- 15 Balbaa M. Enzyme Inhibitors as Therapeutic Tools. *Biochemistry & Physiology*: 2012;01(02).
- 16 Nelson DL, Cox MM, Hoskins AA. Princípios de bioquímica de Lehninger. V.1. (8th edição): Grupo A; 2022.
- 17 De Clercq E. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2002 Jan;1(1):13–25.
- 18 Hilal-dandan R, Brunton L. Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman & Gilman. (2nd edição). Grupo A; 2015.
- 19 DOVEY, H. F.; MCKERROW, J. H.; WANG, C. C. Purine salvage in *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 11, p. 157–167, 1 abr. 1984.
- 20 ROMANELLO. L. Estudos das enzimas adenosina kinase isoforma 1, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase isoformas 1, 2 e 3, adenilsuccinato liase, adenilsuccinato sintetase de *Schistosoma mansoni*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-27102016-102455/publico/LarissaRomanello_DO_original.pdf>.
- 21 Lima, C., Romanello, L. Vista do Modelagem molecular de isoformas e docagem molecular da enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPR) de *Schistosoma mansoni*. Disponível em: <<https://periodicos.unespar.edu.br/luminaria/article/view/3554/2477>>. Acesso em: 23 set. 2024.
- 22 Demeler, B. University of Leathbridge. Biochemistry lecture 4000.
- 23 Monanzi, P. S. Estrutura cristalográfica da enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPR) de *Leishmania tarentolae* complexada com GMP. 2003. 162p, Tese. Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- 24 FOZIA PJ; CRAIG SP; EAKIN AE. Approaching the transition state in the crystal structure of a phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, v. 37, n. 49, 2023.
- 25 Keough DT, Brereton IM, de Jersey J, Guddat LW. The Crystal Structure of Free Human Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase Reveals Extensive Conformational Plasticity Throughout the Catalytic Cycle. *Journal of Molecular Biology*. 2005 Aug;351(1):170–81.

26 JAFFE, J. J., MEYMARIAN, E., & DOREMUS, H. M.. Antischistosomal Action of Tubercidin administered after Absorption into Red Cells. *Nature*, 230(5293), 408–409. 1971. doi:10.1038/230408a0

27 Cleland, W. W. The Low Barrier Hydrogen Bond in Enzymatic Catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 25529–25532 | 10.1074/jbc.273.40.25529 [Internet].

28 Fallon PG. Schistosome resistance to praziquantel. *Drug Resistance Updates*. 1998 Jan;1(4):236–41.