

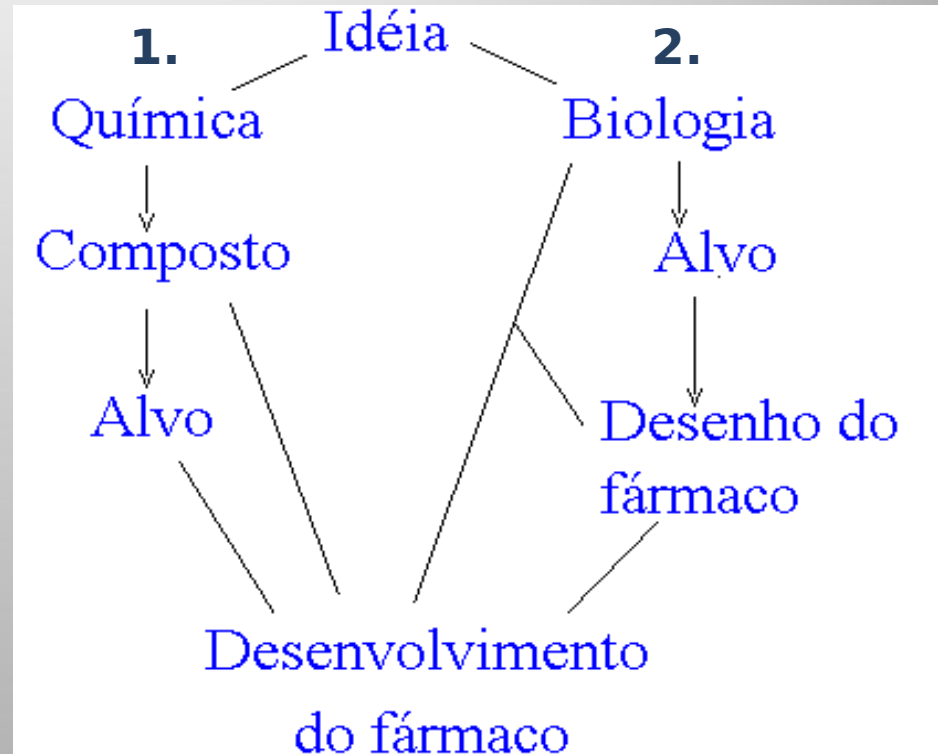
The background of the slide features a grayscale image of a parasite, likely a nematode, shown in a curved, anatomical view. Overlaid on this image is a faint, repeating pattern of nucleotide sequences (A, U, G, C) in a light gray font, suggesting a focus on molecular biology or genetics.

Estratégias para a identificação de alvos para a quimioterapia antiparasitária

Qual é importância do desenvolvimento de quimioterápicos para o controle de doenças parasitárias?

Desenvolvimento de novas drogas

1. Abordagem química: composto já conhecido é usado no desenvolvimento de novos fármacos
2. Abordagem biológica: identificação de novos alvos através de estudos da biologia molecular, bioquímica e fisiologia do parasita e do



Características desejáveis de agentes quimioterápicos

O fármaco deve ser de fácil administração

- Administração oral (mais fácil que administração injetável);
- Número reduzido de doses e curta duração do tratamento (dose única)

Características desejáveis de agentes quimioterápicos

Não deve causar ou deve causar poucos efeitos colaterais no hospedeiro

Reações adversas, mesmo que inofensivas (por exemplo, alteração da cor da urina), devem ser evitadas.

Características desejáveis de agentes quimioterápicos

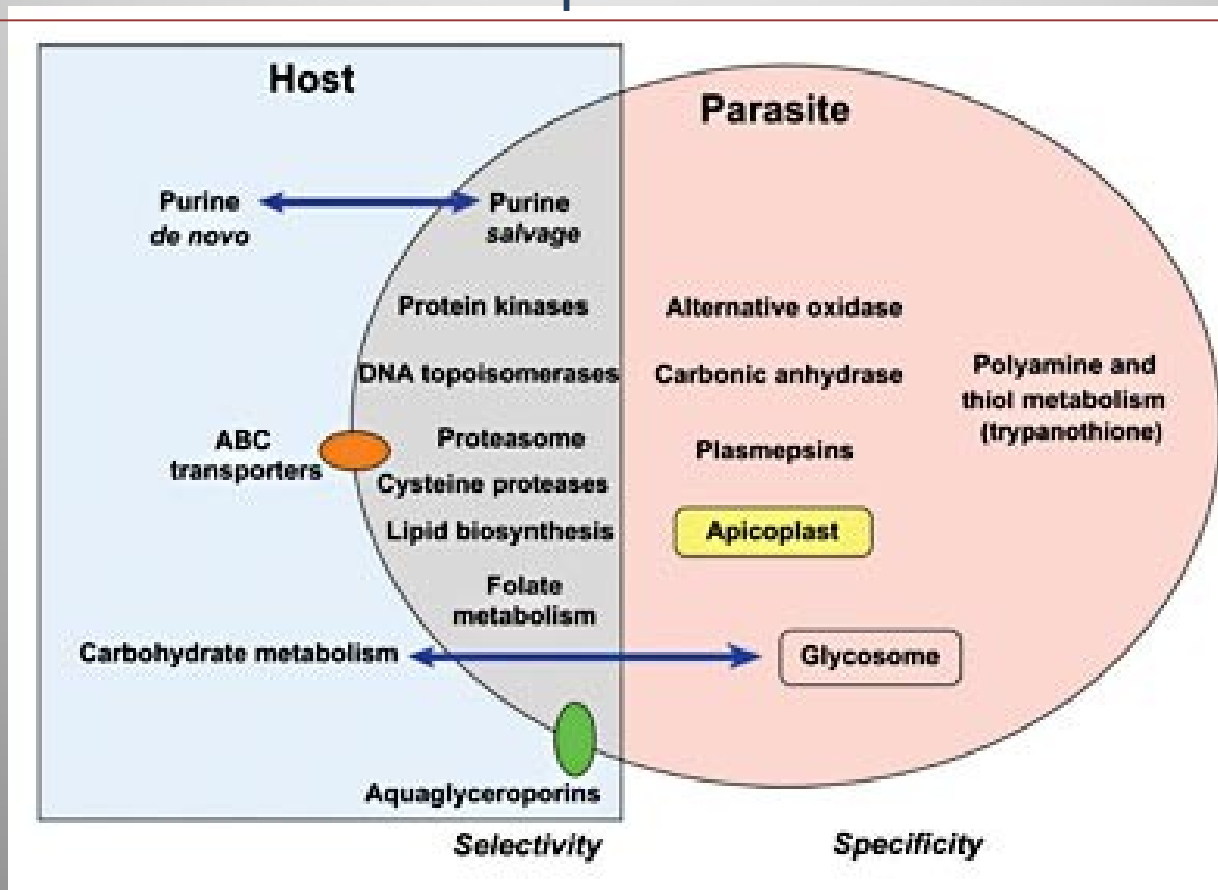
O agente antiparasitário deve ser específico ao parasito

Alvos:

- de preferência que sejam específicos, ou seja, que estejam ausentes no hospedeiro;
- se presentes, deve ter maior afinidade ao parasito do que ao hospedeiro (seletividade)
- Atingir dois pontos da mesma via quando for possível

Principal desafio para o desenvolvimento de quimioterápicos para o tratamento de doenças parasitárias

Parasitas são eucarióticos, assim como o hospedeiro



Necessidade de conhecimento de diferentes aspectos do parasita

- ❖ Aspectos celulares e fisiológicos: compartimentos celulares, tecidos e sistemas
- ❖ Aspectos bioquímicos e moleculares: vias metabólicas, componentes da membrana plasmática e de compartimentos celulares, regulação gênica, mecanismos de variação antigênica
- ❖ Biologia do parasita: ciclo de vida, hábito de vida (intracelular/extracelular), tipo(s) de reprodução (sexuada/assexuada)
- ❖ Interações parasita-hospedeiro/parasita-

Necessidade de conhecimento de diferentes aspectos do parasita

- ❖ Aspectos celulares e fisiológicos: compartimentos celulares, tecidos e sistemas
- ❖ Aspectos bioquímicos e moleculares: vias metabólicas, componentes da membrana plasmática e de compartimentos celulares, regulação gênica, mecanismos de variação antigênica
- ❖ Biologia do parasita: ciclo de vida, hábito de vida (intracelular/extracelular), tipo(s) de reprodução (sexuada/assexuada)
- ❖ Interações parasita-hospedeiro/parasita-

**Estratégias para
a identificação
de alvos
parasitários
para
desenvolvimento
o de
quimioterápicos**



1. Vias metabólicas

2. Genômica

3. Genômica funcional: transcriptomas e proteomas

4. Análises *in silico*

5. Química combinatória

1. Vias metabólicas

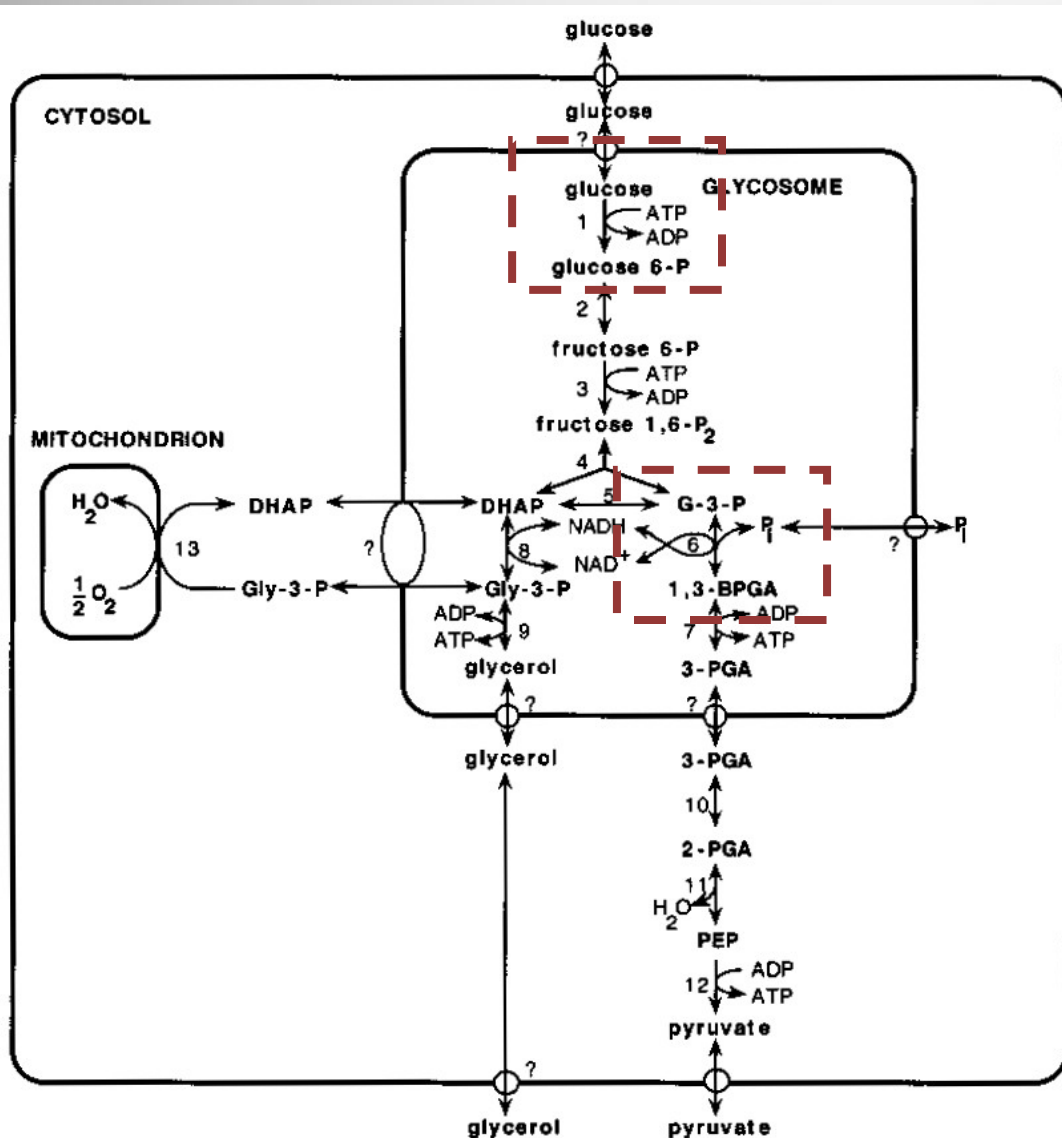
- Isolamento das enzimas de uma via metabólica específica

Estratégia alternativa: busca do gene codificador da enzima; produção recombinante da enzima

- Caracterização estrutural: sequenciamento de proteínas, determinação da estrutura 2-D
- Busca de similaridades em bancos de dados
- Ensaio biológicos para a determinação de atividade enzimática; ação de inibidores (candidatos a drogas) e anticorpos

Glicólise

Glicólise em tripanossomatídeos



Hexoquinase (HQ)

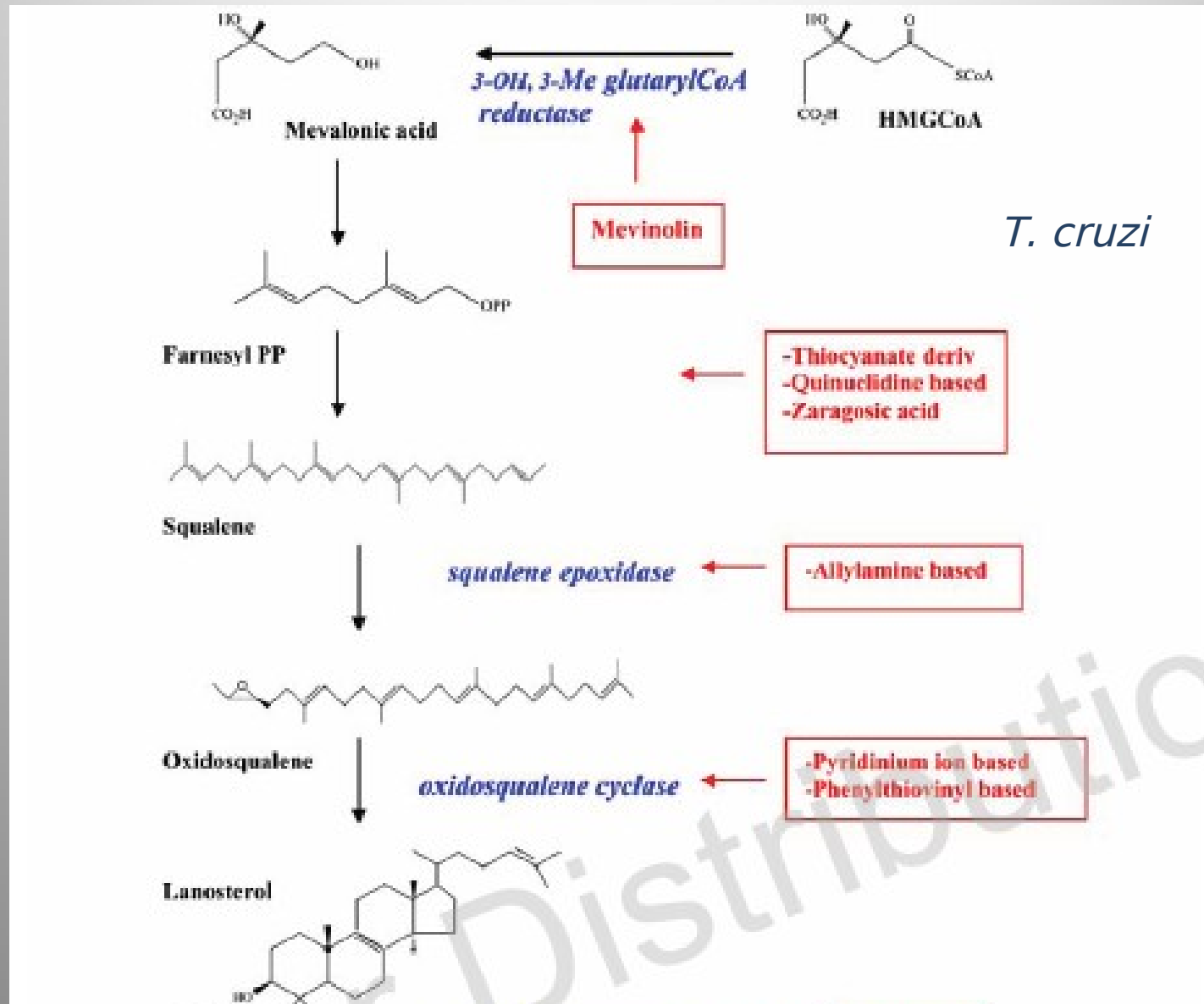
fosforilação da glicose em glicose 6-fosfato

- **difosfato inorgânico** *T. cruzi*
- **bisfosfatos**

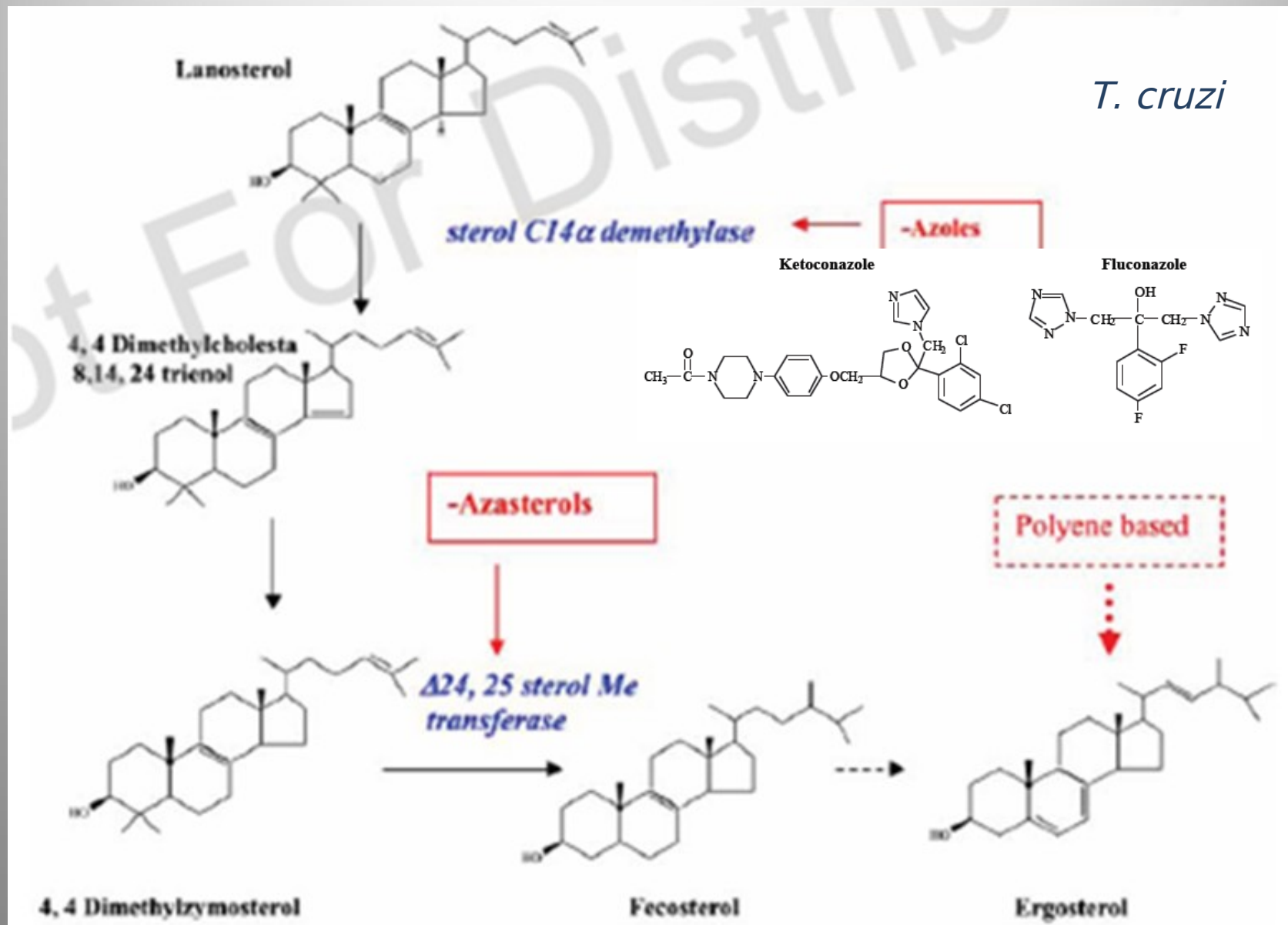
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

conversão do gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato *T. cruzi*

Biossíntese de ergosterol



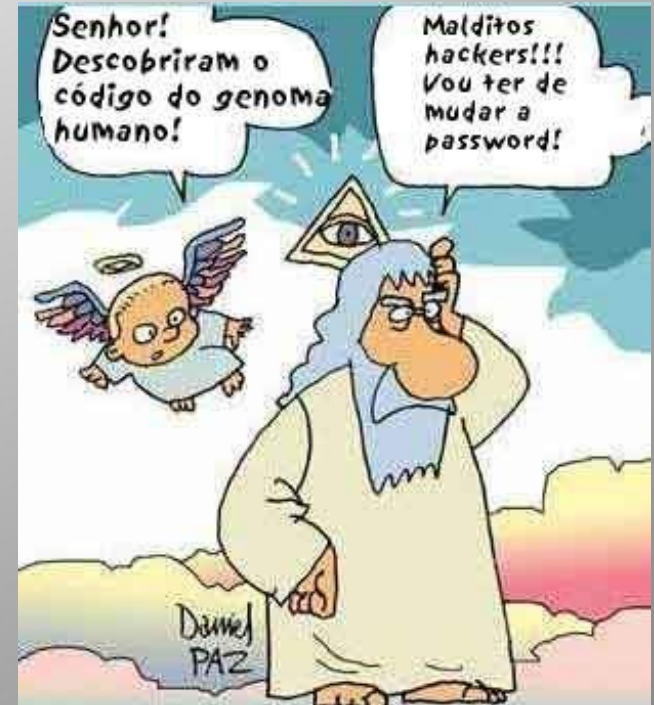
Biossíntese de ergosterol



2. Genômica

Genoma: código hereditário completo de um organismo

Genômica: elucidação do genoma de um organismo



Envolve técnicas de sequenciamento de nucleotídeos em larga escala e análises bioinformáticas:

- Reconstrução das vias metabólicas de um organismo
- Em parasitas, os dados podem ser utilizados para:
 - Busca por estruturas relacionadas a alvos conhecidos para drogas
 - Comparação com vias metabólicas do

Alguns genomas elucidados de parasitas

Trypanosoma cruzi

Trypanosoma brucei

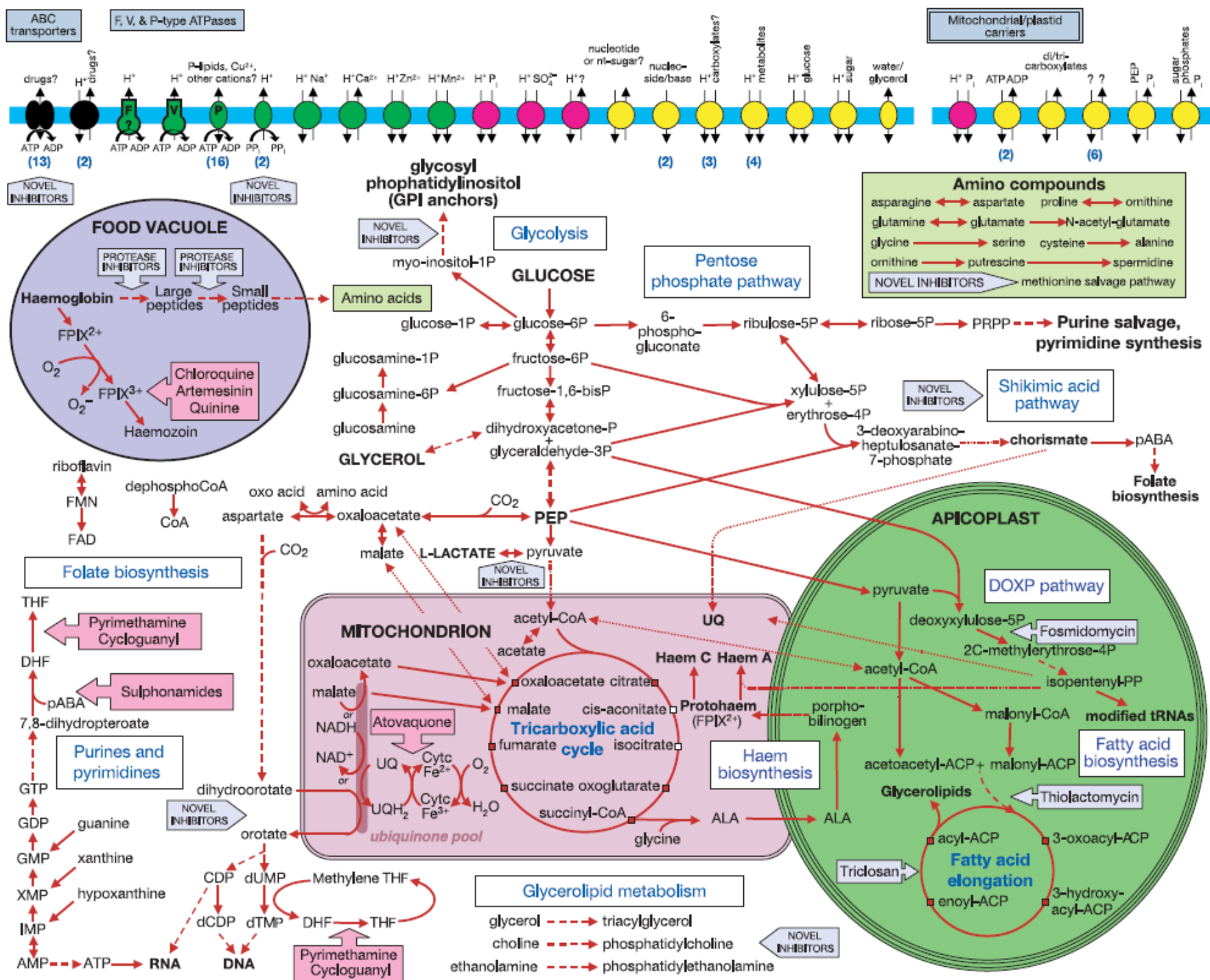
Leishmania major

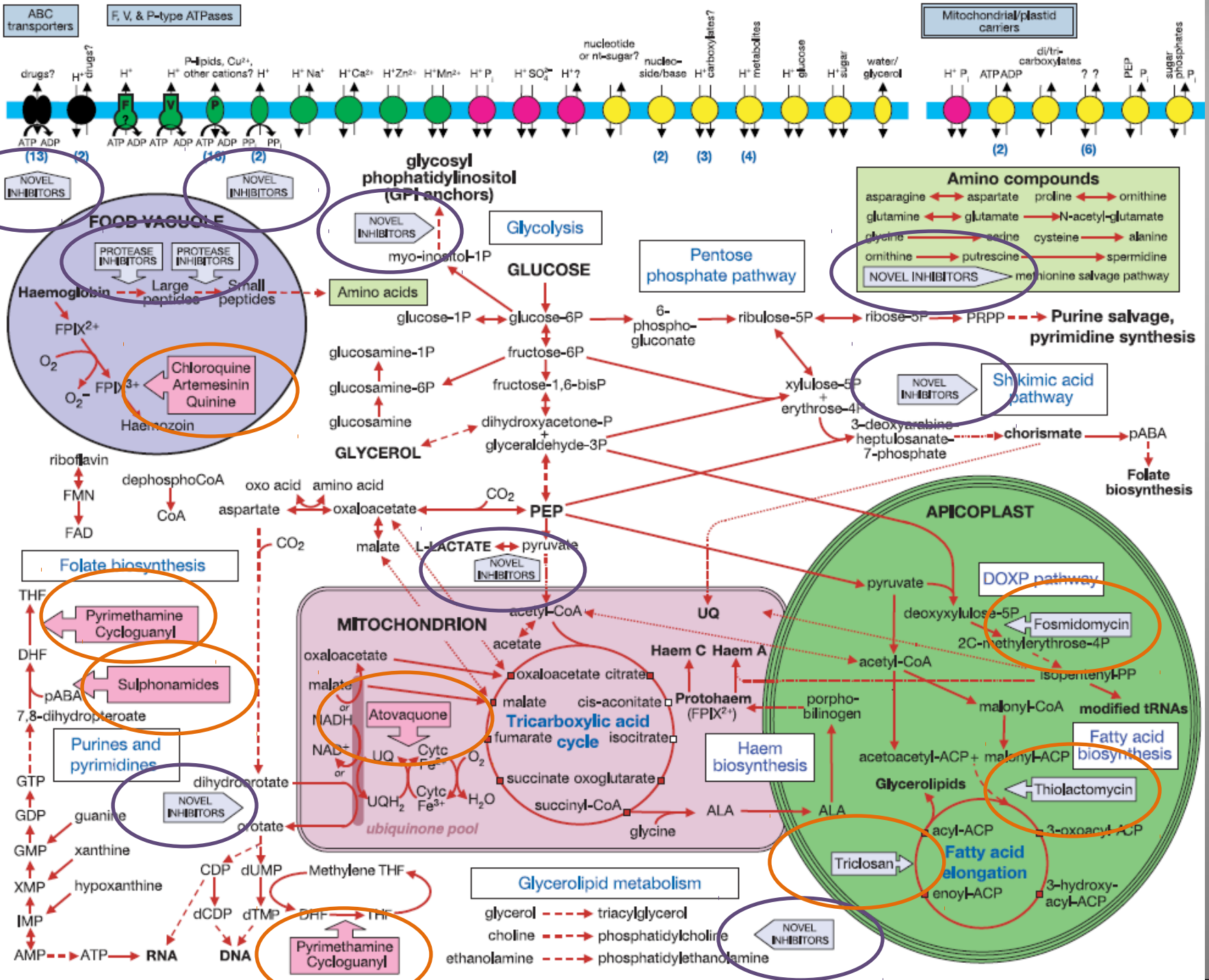
Plasmodium falciparum, vivax

Schistosoma mansoni



Mapa metabólico predito a partir da elucidação do genoma de *P. falciparum*





Genoma de *S. mansoni*

Nature (2009), 460: 352-360



Revelou potenciais alvos para o desenvolvimento de quimioterápicos:

- Receptores nucleares
- Tiorredoxina glutationa redutase*

Nature Medicine (2008), 14: 407-412

ação comprovada de oxadiazol 2-oxio



Genoma de *S. mansoni*

Nature (2009), 460: 352-360



- Metabolismo de lipídeos
- Canais iônicos
- Receptores acoplados à proteína-G (GPCR)
- Quinases
- Proteases
- Neuropeptídeos

3. Genômica funcional: transcriptomas e proteomas

Transcriptoma: conjunto de transcritos (RNAm) em um organismo, célula ou compartimento celular

Envolve técnicas de análise de ácidos nucleicos, tais como bibliotecas de cDNA, microarranjos (de DNA/de oligonucleotídeos) e pirosequenciamento, associadas a análises bioinformática

Permite a identificação de transcritos específicos de uma fase do ciclo de vida ou em um compartimento celular do parasito ou ainda a análise da modulação da expressão gênica perante um desafio

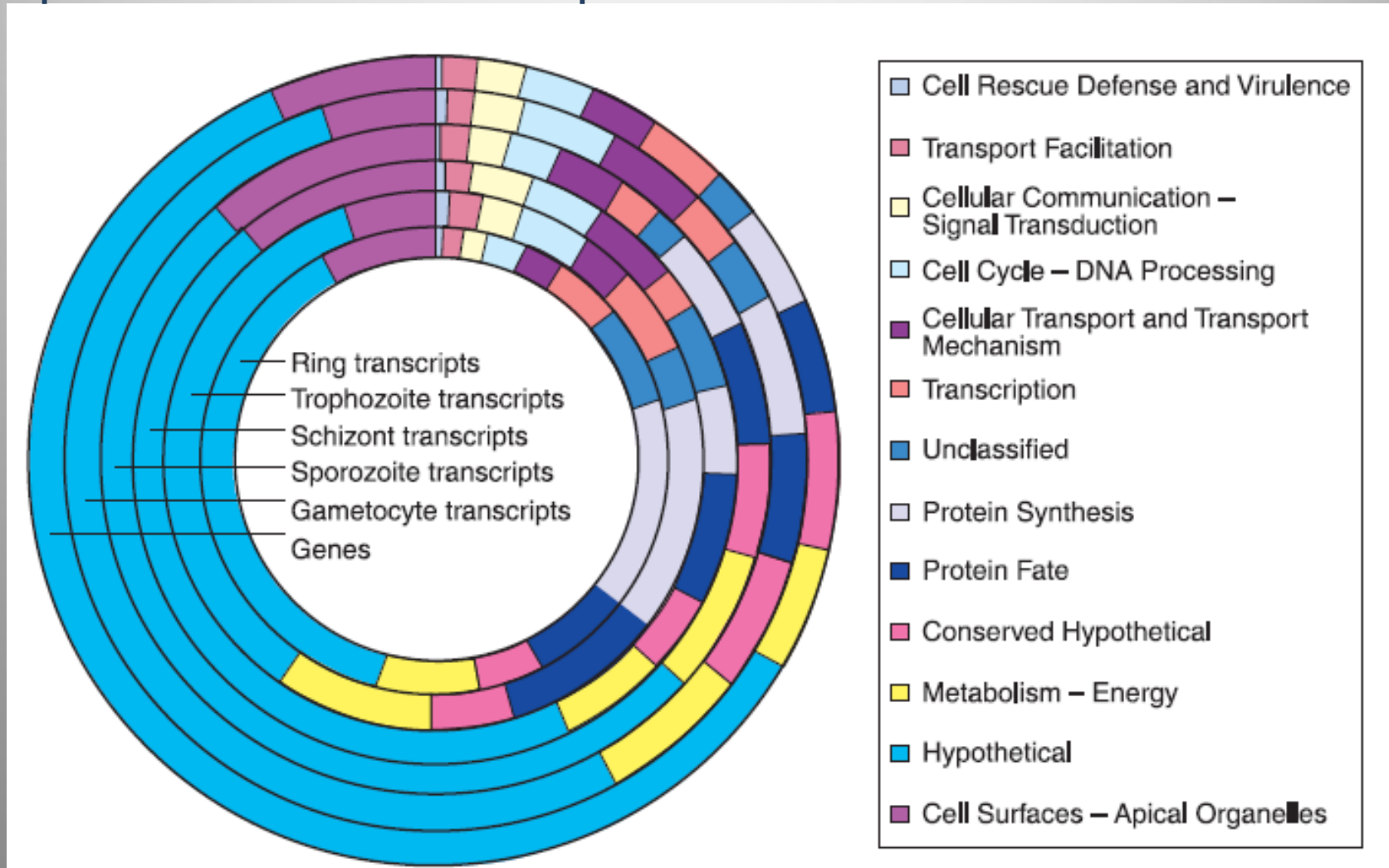
3. Genômica funcional: transcriptomas e proteomas

Proteoma: conjunto de proteínas em um organismo, célula ou compartimento celular

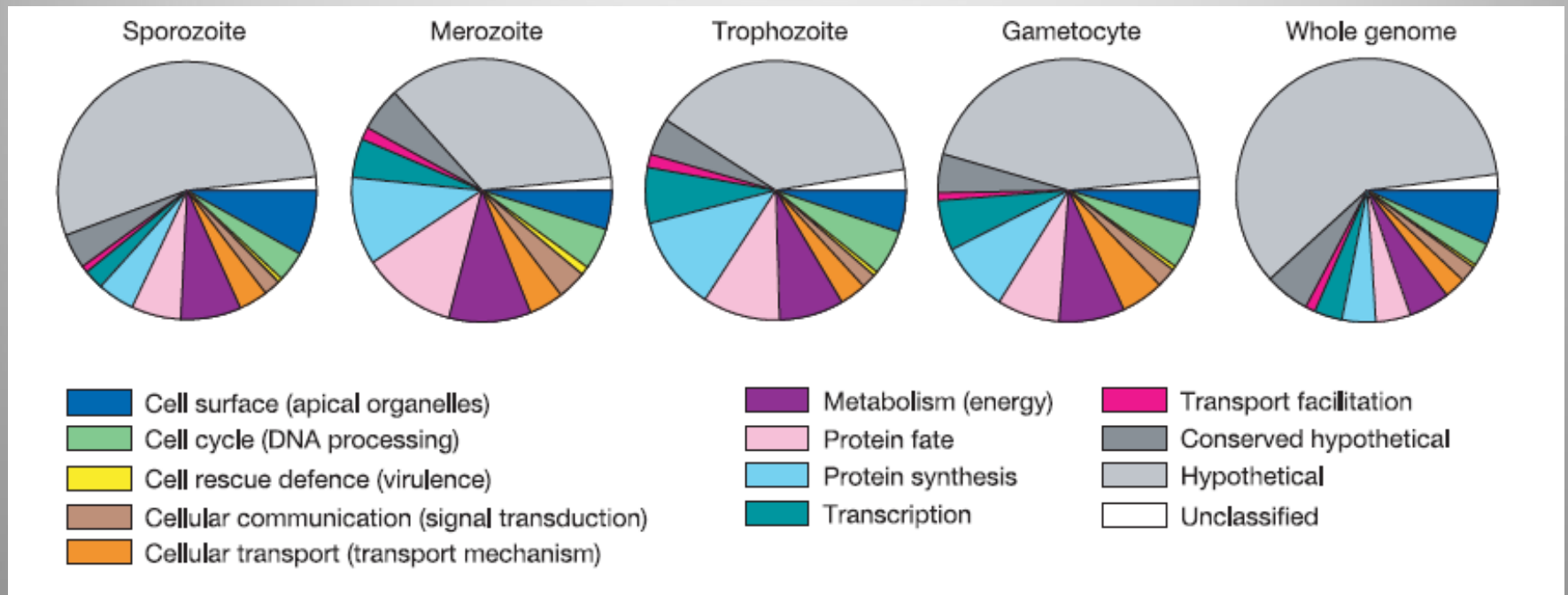
Envolve técnicas de separação de proteínas (métodos cromatográficos, eletroforéticos) associadas a métodos de análise estrutural (espectrometria de massas) e análises bioinformáticas

Permite a identificação de proteínas presentes em uma fase do ciclo de vida ou em um compartimento celular do parasito ou ainda a modulação frente a um desafio

Transcriptoma de *P. falciparum* em diferentes estágios do ciclo de vida: identificação de genes expressos em fases específicas



Proteoma de *P. falciparum* em diferentes estágios do ciclo de vida: identificação de proteínas presentes em fases específicas



Proteoma de *P. falciparum* em diferentes estágios do ciclo de vida: identificação de proteínas presentes em fases específicas

Table 2 Examples on enzymes in stage-specific metabolic pathways

Locus	Stage				Enzyme	EC number†	Reaction catalysed
	Spz*	Mrz*	Tpz*	Gmt*			
End of glycolysis							
PF10_0363	1.2	–	2.4	–	Pyruvate kinase	2.7.1.40	<i>P</i> -enolpyruvate to pyruvate
MAL6P1.160	8.6	66.9	18.8	14.7	Pyruvate kinase		
PF13_0141	46.2	83.9	70.9	78.8	L-lactate dehydrogenase	1.1.1.27	Pyruvate to lactate
TCA cycle and oxidative phosphorylation							
PF10_0218	12.3	–	–	–	Citrate synthase	4.1.3.7	Acetyl coA + oxaloacetate to citrate
PF13_0242	3.2	–	16.9	8.8	Isocitrate dehydrogenase (NADP)	1.1.1.41	Isocitrate to 2-oxoglutarate + CO ₂
PF08_0045	2.9	–	2.2	23.1	2-Oxoglutarate dehydrogenase e1 component	1.2.4.2	2-Oxoglutarate to succinyl CoA
PF10_0334	–	–	3.5	27.7	Flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase	1.3.5.1	Succinate to fumarate
PFL0630w	3.7	–	–	12.1	Iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase		
PF14_0373	–	–	–	12.7	Ubiquinol cytochrome oxidoreductase	1.10.2.2	Ubiquinol to cytochrome c reductase in electron transport
PFB0795w	–	–	–	14.2	ATP synthase F1, α -subunit		
PF1365w	–	–	–	8.8	Cytochrome c oxidase subunit	1.9.3.1	
PF1340w	–	–	–	8.8	Fumarate hydratase	4.2.1.2	Fumarate to malate
MAL6P1.242	30.4	–	–	40.9	Malate dehydrogenase	1.1.1.37	Malate to oxaloacetate

Enzimas específicas de gametócitos: alvos para o desenvolvimento de drogas de bloqueio de transmissão

Transcriptoma de *S. mansoni*: identificação de potenciais alvos para drogas

Table 4 Chemotherapy in schistosomiasis: potential new drug targets

SmAEs	Gene	Similar to	Remarks
C710243.1, C719264.1	Nicotinic acetylcholine receptor	<i>Felis catus</i> , <i>H. sapiens</i>	Levamisole and pyrantel bind nematode nAChR
C705718.1	Choline O-acetyltransferase	<i>D. melanogaster</i>	In filarial worms the enzyme has a key role in motility; ChAT is inhibited by low doses of ethacrynic acid
C713648.1	Acetylcholinesterase	<i>Schizaphis graminum</i>	Metrifonate inhibits acetylcholinesterase
C708367.1	Muscarinic acetylcholine receptor	<i>D. melanogaster</i>	Levamisole and pyrantel possibly bind nematode mAChR
C603771.1, C711869.1	Glutamate transporter <i>Glut2</i> and <i>AmEAAT</i>	<i>C. elegans</i> , <i>Apis mellifera</i>	Removes glutamate, an excitatory neurotransmitter, and permits normal neurotransmission; putative drug target if significantly different from the mammalian protein
C610861.1, C705975.1, C716672.1, C719080.1	Glutamate receptors	<i>Mus musculus</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>Rattus norvegicus</i> , <i>Lymnaea stagnalis</i>	Ivermectin is believed to exert its anthelmintic effects by binding to glutamate-gated chloride channels
C714193.1	GABA transporter	<i>R. norvegicus</i>	Piperazine binds to <i>Ascaris</i> GABA receptors
C702111.1	Serotonin receptor	<i>Anopheles gambiae</i>	
C609540.1, C718443.1	L-type calcium channel alpha subunit	<i>Porcellio scaber</i> , <i>Stylophora pistillata</i>	Praziquantel is believed to act through tegument Ca ⁺⁺ channels
C601467.1, C609572.1, C602142.1	Cyclophilin-like and matrin cyclophilin	<i>D. melanogaster</i> , <i>R. norvegicus</i>	Cyclosporin binds to cyclophilin and has an antiparasitic effect against helminths and protozoa
C605281.1, C610889.1, C608660.1	Innexins (<i>Unc7</i> , <i>Unc9</i> and <i>Inx1</i> Gap junction proteins)	<i>C. elegans</i>	Neuromuscular ion channel exclusive from invertebrates; proposed as targets in cancer chemotherapy
C600095.1, C717578.1, C703546.1	DNA polymerase delta	<i>D. melanogaster</i> , <i>H. sapiens</i> , <i>A. gambiae</i>	Target for antiviral drugs

4. Análises *in silico*

Utilização de ferramentas bioinformáticas para a busca de alvos potenciais para o desenvolvimento de quimioterápicos nos dados dos genomas, transcriptomas e proteomas de parasitas (“mineração” dos dados)

Atribuição de funções aos genes codificadores de proteínas hipotéticas;

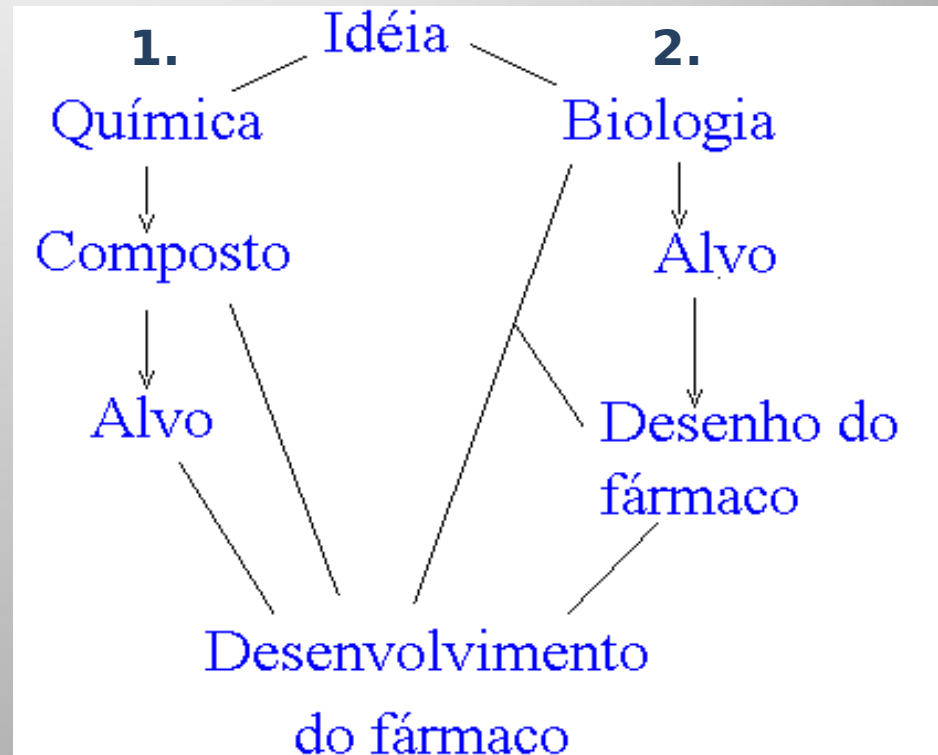
Análise *in silico* para o desenvolvimento de quimioterápicos



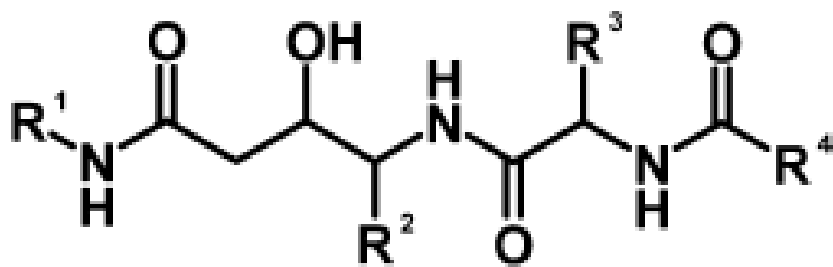
5. Química combinatória

1. Abordagem química: composto já conhecido é usado no desenvolvimento de novos fármacos

2. Abordagem biológica: identificação de novos alvos através de estudos da biologia molecular, bioquímica e fisiologia do parasita e do

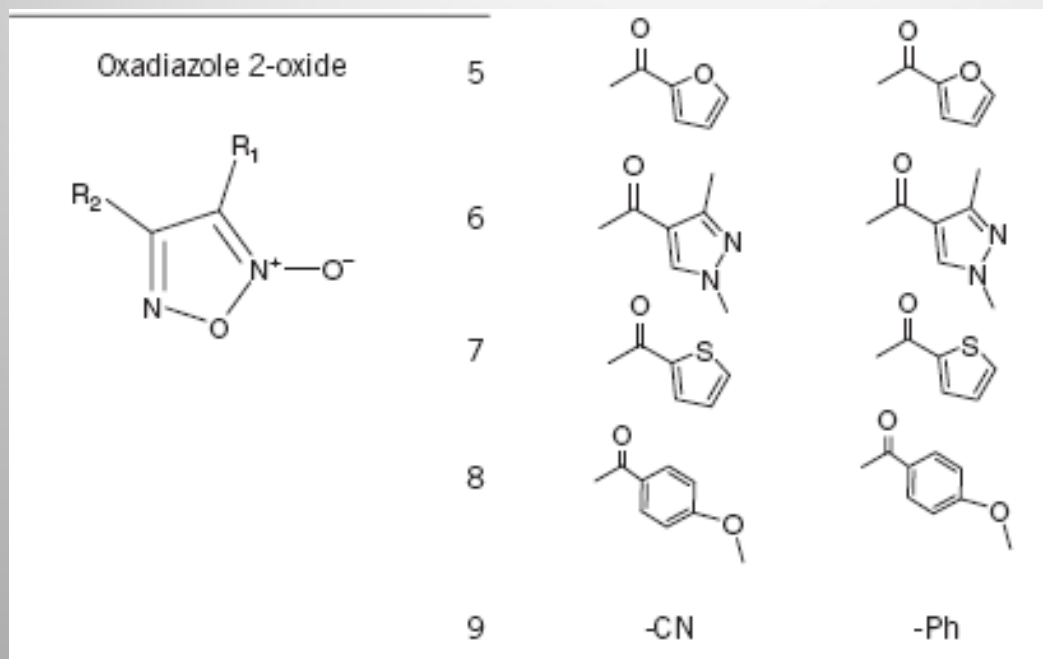


Construção de bibliotecas combinatórias de drogas



Bioorg Med Chem Lett (1998), 8:2315-2320

Esqueleto de estatina da biblioteca combinatória de inibidores para plasmepsina II de *P. falciparum* com variações em R1-R4 (13.020 análogos)

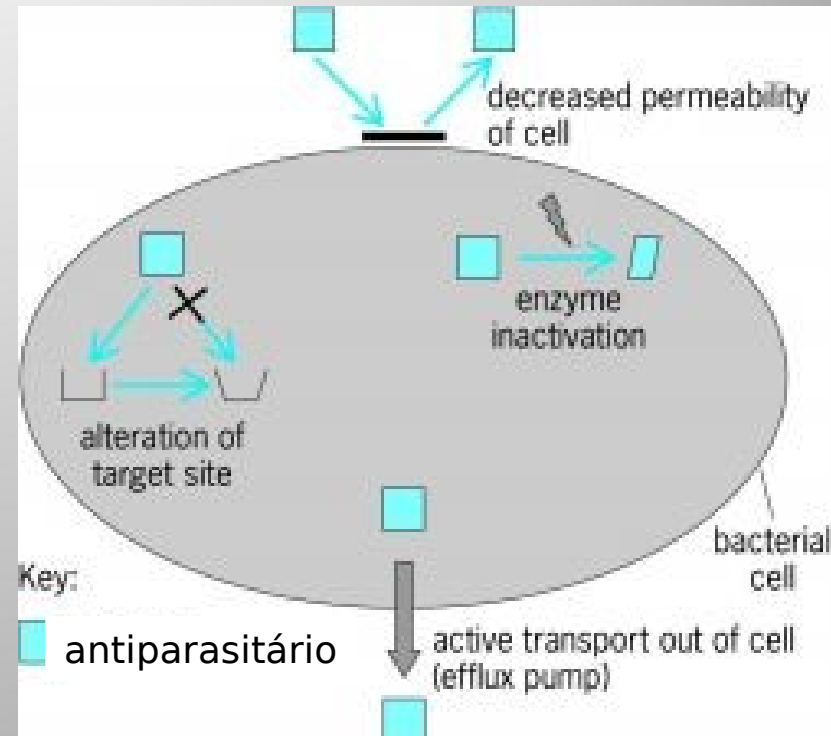


Nature Medicine (2008), 14:
407-412

Ação de oxidazol 2-óxido e análogos sobre a
tiorredoxina glutathiona redutase de *S. mansoni*

Mecanismos envolvidos com resistência a antiparasitários

- 1- conversão da droga para uma forma inativa
- 2- alteração da permeabilidade da membrana à droga, diminuindo influxo e/ou aumentando a excreção
- 3- ativação de vias metabólicas alternativas*
- 4- alteração do alvo da droga, diminuindo a afinidade da droga
- 5- aumento da concentração do alvo, diminuindo as consequências metabólicas



❖ Utilização indiscriminada das drogas ou a exposição a doses subletais de um agente antiparasitário leva à seleção de parasitas resistentes ao agente

Constante necessidade de desenvolvimento de novos fármacos

Bibliografia sugerida

Gutteridge W.E. Chemotherapy *In* Modern Parasitology: A Textbook of Parasitology (Cox F.E.G.), 2ª. edição, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993, pp. 219-242.

Rey L. Bases da Parasitologia Médica, 2ª. edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.