MIGLUSTATO: IMUNOMODULAÇÃO É UM CAMINHO PARA O REPOSICIONAMENTO.

L. G. S. SANTOS¹, K. N. JATAHY², L. C. TORRES², M. G. R. PITTA¹ e M. J. B. M. RÊGO¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT), Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT).

² Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Laboratório de Pesquisa Translacional.

E-mail para contato: lucasbiomedico@live.com

RESUMO – Doenças inflamatórias desafiam os pesquisadores por causa da baixa qualidade de vida que elas proporcionam aos pacientes, seja diretamente com os sintomas das doenças, que podem comprometer localmente ou sistemicamente articulações importantes, ou seja através dos medicamentos que possuem efeitos colaterais graves, podendo comprometer fígado e rins. Uma alternativa para busca de novos medicamentos, é através do reposicionamento de fármacos, que há algum tempo tem ganhado cada vez mais notoriedade por causa dos sucessos de reposicionamento nas diversas áreas da medicina. Este estudo visa elucidar possíveis mecanismos imunomoduladores do aprovado para o tratamento da doença de Gaucher, Miglustato. Células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) de 10 controles saudáveis foram cultivadas e tratadas com miglustato à 10 µM e 100 µM. Através de citometria de fluxo, foi possível observar a redução significativa na produção de Granzima B pelos linfócitos TCD4 na dose de 10 µM ($p = 0,0098$), e TCD8 na dose de 100 µM ($p = 0,0098$), mostrando um possível efeito imunomodulador do composto.

ABSTRACT – Inflammatory diseases challenges the researchers because of the poor life quality that it provides to the patients, either directly by the diseases symptoms, which can compromise locally or systematically important joints, or either through the medicines that have serious side effects, which can compromise the liver and the kidneys. One alternative in search for new medicines is through drug repositioning, which has for some time, been gaining more notoriety because of the repositioning successes in the various medical areas. This study aim elucidates possible immunomodulatory mechanism of the approved for gaucher disease, miglustat. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 10 healthy controls were harvested and treated with miglustat at 10 µM and 100 µM. Through flow cytometry we could observe significant reduction on Granzyme B production by TCD4 lymphocytes in the dose of 10 µM ($p = 0,0098$), and by TCD8 lymphocytes in the dose of 100 µM ($p = 0,0098$), showing a possible immunomodulatory effect of the compound.

1. INTRODUÇÃO

Os processos de busca e síntese de novas substâncias para serem testadas na investigação de novos candidatos a medicamentos é bastante dispendiosa, visto que pouquíssimos compostos vencem as etapas pré-clínicas e clínicas dos estudos farmacocinéticos e toxicológicos (VIEGAS JR & BOLZANI, 2006; CHONG & SULLIVAN JUNIOR, 2007). Baseado nisso, a academia e a indústria farmacêutica têm redirecionado seu

foco para o reposicionamento de fármacos já inseridos no mercado. Reciclar a utilização de um determinado medicamento para tratar outros tipos de doenças caracteriza uma abordagem inovadora e original, buscando uma nova utilização para uma molécula com segurança e farmacocinética já conhecidos. (CHONG & SULLIVAN JUNIOR, 2007).

Zavesca® Miglustato, é um fármaco já aprovado e utilizado na clínica da doença de Gaucher. Trata-se de um composto interessante para reposicionamento, pois é um inibidor de glicosilceramida sintase, enzima responsável pelo primeiro passo na síntese dos glicosfingilipídios (GSL), onde sabe-se que estas são estruturas importantes em diversos processos celulares como adesão, sinalização e comunicação (HELENIUS; AEBI, 2001).

Este trabalho visa elucidar um possível mecanismo imunomodulador do já aprovado para doença de gaucher, miglustato, visando encontrar novas alternativas para doenças inflamatórias onde reposicionamento de fármacos mostra-se uma ferramenta útil e de baixo custo para esta finalidade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DE CÉLULAS PBMC PARA REALIZAÇÃO DA CULTURA CELULAR

As células mononucleares (PBMC) foram separadas do sangue periférico por meio de gradiente de densidade descontinua sobre Histopaque 1077 (Sigma Aldrich). O tubo contendo o Histopaque 1077 e o sangue, foi centrifugado a 300 x g por 30 minutos a 21°C em centrifuga sem freio. Em seguida, foram aspiradas com pipeta Pasteur, as camadas contendo as células mononucleares. As células então foram lavadas colocando-se 8 ml de solução PBS 1X concentrado e centrifugado a 400 x g por 5 minutos a 21°C, descartando-se o sobrenadante. Após a lavagem, as células PBMC foram ressuspensas em 5 mL de meio RPMI 1640 suplementado 0,5% de penicilina (Sigma®) e 10% soro bovino fetal e foi realizada a contagem das células por meio da câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi verificada pela utilização de Trypan Blue (SIGMA, St. Louis, MO). Após a cultura, as células PBMC foram submetidas a estímulo com IL-2 + PHA (do inglês Phytohaemagglutinin). As doses do miglustato que foram escolhidas para tratar a cultura foram de 10 µM e 100 µM.

2.2 MARCAÇÃO INTRACELULAR DE GRANZIMA B E CÉLULAS T

Após a cultura das PBMC, 2×10^6 de células foram utilizadas para o protocolo de marcação intracelular para granzima B e linfócito TCD8 de acordo com o manual do fabricante. Os anti-corpos monoclonais utilizados foram anti-granzima B, anti-CD3, e anti-CD8. A aquisição foi realizada através do FACSVerse (BD Biosciences, CA) e os resultados obtidos foram analisados com o programa BD FACSuite™ (BD Biosciences, CA). Expressando os valores em percentuais.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando o software GraphPad Prism®

versão 6. O teste estatístico utilizado nas análises foi o teste t não-paramétrico de Wilcoxon, como as variáveis não seguem distribuição normal, os resultados são apresentados em mediana, máxima e mínimo, utilizando-se o teste com comparação pareada. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do miglustato na produção de Granzima B

Na cultura de PMBC tratada com miglustato ($n = 10$), podemos observar uma diminuição significativa nos níveis granzima B produzidas, tanto por linfócitos TCD4, quanto por linfócitos TCD8. A diminuição atribuída possivelmente ao miglustato nas doses de 10 μM para linfócitos TCD4 ($p = 0,0098$) (Figura 1A), e na dose de 100 μM para os linfócitos TCD8 ($p = 0,0098$) (Figura 1B).

Figura 1: Imunofenotipagem para granzima B de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Cultura de PBMC ($n = 10$) tratada com miglustato à 10 μM e 100 μM no tempo de 24 horas. A: A redução nos níveis da granzima B foi observada através da comparação entre a condição estimulada (IL2+PHA) e a condição estimulada e com miglustato a 10 μM (IL2+PHA+10 μM) para TCD4. B: A redução nos níveis da granzima B foi observada através da comparação entre a condição estimulada (IL2+PHA) e a condição estimulada e com miglustato a 100 μM (IL2+PHA+100 μM) para TCD8. (**= $p < 0.01$). As barras representam mediana, máximo e mínimo.

Os linfócitos são uma das principais células produtoras de granzima B, onde este tipo de granulo é um dos principais mediadores de citotoxicidade destas células, responsável pela degradação da membrana do antígeno (GOLDBACH-MANSKY et al., 2004). Estudos mostram que pacientes com doenças inflamatórias como a artrite reumatoide, possuem altos níveis de granzima B sérica, e no líquido sinovial, levando a acreditar que esse tipo de resposta inflamatória citotóxica, está associada a doença (TAK et al., 1999; GOLDBACH-MANSKY et al., 2004). Nossos resultados mostram redução significativa dos níveis de granzima B produzida tanto por células TCD4⁺ quanto por células TCD8⁺, sugerindo que o miglustato,

através do reposicionamento, e de novos estudos, pode se tornar uma ferramenta inovadora no combate a doenças desse tipo.

4. CONCLUSÃO

No presente estudo foi observado que o miglustato teve a capacidade de diminuir a produção de granzima B dos linfócitos TCD4 e TCD8, fato importante para doenças inflamatórias, cabendo mais estudos para elucidar melhor o possível efeito imunomodulador do composto.

5. REFERÊNCIAS

- Viegas Jr, C.; Bolzani, V. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Qim. Nova*, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- Chong, C.R; Sullivan, D.J. New uses for old drugs. *Nature*. n. 448, p. 645-646, 2007.
- Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res.* **2006**, 123, 399-410.
- Helenius, A.; Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*. **2001**, 291, 2364-2369.
- Goldbach-Mansky R, Suson S, Wesley R, Hack CE, El-Gabalawy HS, Tak PP. Raised granzyme B levels are associated with erosions in patients with early rheumatoid factor positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, **2005**, 64, 715-721.
- Tak PP, Spaeny-Dekking L, Kraan MC, Breedveld FC, Froelich CJ, Hack CE. The levels of soluble granzyme A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol*, **1999**, 116, 366-372.

6. AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-IF). Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).