

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

LUCAS GABRIEL SOUSA SANTOS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E
ANTINEOPLÁSICA DO ZAVESCA® (MIGLUSTATO)**

**Recife
2017**

LUCAS GABRIEL SOUSA SANTOS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E
ANTINEOPLÁSICA DO ZAVESCA® (MIGLUSTATO)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Co-orientadora: Dra. Leuridan Cavalcante Tôres

**Recife
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Santos, Lucas Gabriel Sousa

Avaliação *in vitro* da atividade imunomoduladora e antineoplásica do Zavesca (Miglustato)/ Lucas Gabriel Sousa Santos. – 2017.

55 f. : il.

Orientador: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.

Coorientadora: Leuridan Cavalcante Torres.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2017.

Inclui referências.

1. Câncer 2. Farmacologia I. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo II. Torres, Leuridan Cavalcante (coorient.) III. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 334

LUCAS GABRIEL SOUSA SANTOS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E
ANTINEOPLÁSICA DO ZAVESCA® (MIGLUSTATO)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovado em: 09/03/2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandes/ Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Eliane Campos Coimbra/ Universidade de Pernambuco

Profa. Dra. Bianka Santana dos Santos/ Universidade Federal de Pernambuco - Centro
Acadêmico do Agreste (CAA)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela fonte de força e segurança.

A minha mãe **Verônica**, e ao meu avô **Manoel**, pessoas mais importantes da minha vida, onde sem eles, com certeza, nada disso teria dado certo.

Ao meu pai **Humberto**, minha avó **Vanilda**, meu tio **Mozart** minhas irmãs **Luma Hannah** e **Lara Fernanda**, pelo carinho, preocupações, orações e apoio em todos os sentidos.

Meus tios **Marconi** e **Gilvania**, pelo apoio incondicional que me deram desde minha chegada a Recife.

Ao professor Dr. **Moacyr Rêgo**, por ter me aceitado e confiado a mim este trabalho, e por toda orientação, preocupação e apoio nessa jornada.

A professora Dra. **Leuridan Torres**, por ter me aceitado no laboratório de pesquisa translacional, dando início a minha jornada científica.

Aos meus amigos e irmãos **Phellype Alves** e **Geórgia Oliveira** pelo apoio nas horas difíceis, bons conselhos e momentos felizes.

Aos meus primos **Luíz, Cláudio, Marcos e Igor**.

A todos os meus amigos, e familiares que sempre me apoiaram e não se distanciaram de mim, mesmo eu mais afastado por causa das tarefas.

A todos os amigos e irmãos que fiz no laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP, e no LINAT, onde sem eles também, nada disso teria dado certo.

RESUMO

O reposicionamento de fármacos é hoje uma das melhores estratégias de se procurar um novo candidato a medicamento para ser testado na clínica. Reposicionar um fármaco já usado na clínica é vantajoso e menos custoso, pois já se tem o conhecimento de sua farmacocinética e a segurança de um fármaco já inserido no mercado. Esta estratégia inovadora pode-se aplicar ao câncer, que se utiliza dos glicolipídios de membrana para sua instalação e progressão. Através disso, inibidores de glicosilação podem ser uma ferramenta estratégica no combate a essa doença, pois a inibição da síntese destas estruturas pode ajudar no controle da progressão tumoral. Por ser um inibidor de glicosilceramida sintase, o Zavesca® Miglustato mostra-se um forte candidato a esse propósito, atuando na enzima que é o primeiro passo na síntese dos glicolipídios, a glicocerebrosidade. Além da contribuição para a atividade antineoplásica, o outro objetivo do trabalho é identificar o seu efeito na imunomodulação, onde a diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias é interessante para o controle de doenças com o cunho inflamatório. Para avaliar a atividade imunoduladora, foi realizado ELISA de sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c tratados com miglustato. Para observar o efeito antineoplásico e seletivo do composto foi realizado ensaio com brometo de tetrazolium (MTT). O miglustato não se mostrou tóxico em células normais mononucleadas de sangue periférico e esplenócitos de BALB/c em concentrações de até 100 μM . O efeito imunomodulador do composto foi observado com a diminuição significativa da expressão de $\text{IFN-}\gamma$ ($p = 0,0078$) na dose de 100 μM e redução significativa nos níveis de IL-17A nas doses de 10 μM ($p = 0,0186$) e 100 μM ($p = 0,0020$). O miglustato não mostrou efeito citotóxico nas linhagens avaliadas, contudo apresentou efeito antimigratório frente a linhagem de glioblastoma humano NG-97. Foi possível observar também que ocasionou uma diferença significativa no perfil das populações de células T nas doses de 10 μM ($p = 0,0371$) e na dose de 100 μM ($p = 0,002$), induzindo uma alteração na proporção CD4/CD8. Foi observado também que o miglustato conseguiu inibir significativamente a produção de granzima B pelos linfócitos TCD4 e TCD8 nas doses de 10 μM ($p = 0,0098$) e na de 100 μM ($p = 0,0098$). Assim, o miglustato mostrou-se efetivo em inibir citocinas pró-inflamatórias, inibir migração, alterar populações de células T e inibir a produção de granzima B pelos linfócitos TCD4+ e TCD8+.

Palavras-chave: Reposicionamento de fármaco, glicoesfingolipídios, inflamação, câncer, N-butiril-deoxinojirimicina.

ABSTRACT

The drug repurposing is now one of the best ways to look for a new candidate drug for testing in the clinic, once the process of creation of a new drug is expensive and costly, knowing that few compounds win the pre-clinical stages. Repositioning a drug already used in the clinic, it is safer and less costly, for knowing its pharmacokinetics and safety of a drug already commercialized in the market. Due this, that innovative technique could be apply to cancer, once it uses the membrane glycolipids to onset, and progression. Therefore, glycosylation inhibitors may be a new tool in the fight against this disease, because of inhibition of the synthesis of these structures, it can help in controlling the progression of the disease. For being an inhibitor of glucosylceramide synthase, Zavesca® Miglustat is shown to be a strong candidate for this purpose, acting on the enzyme that is the first step in the glycolipids synthesis. In addition to the contribution to the neoplastic activity, another objective of the study is to identify its effect on immunomodulation, where the reduction of proinflammatory cytokine production is interesting for the controlling of inflammatory diseases. To assess the immunomodulatory activity, was performed ELISA of culture splenocytes supernatant of BALB/c treated with miglustat. To observe the antineoplastic and the selective effect of the compound, was carried out the MTT assay. Miglustat was not shown to be toxic in normal peripheral blood mononuclear cells and BALB/c splenocytes at concentrations up to 100 μ M. The immunomodulatory effect of the compound was observed with a significant decrease in IFN- γ production ($p = 0.0078$) at the dose of 100 μ M and a significant reduction in IL-17A levels at doses of 10 μ M ($p = 0.0186$) and 100 μ M ($p = 0.0020$). Miglustat did not show antineoplastic effect against tested cell lines. However, it caused a difference in the profile of T cell populations, inducing a change in the CD4/ CD8 ratio. It was also observed that miglustat was able to significantly inhibit the production of granzyme B by TCD4+ and TCD8+ lymphocytes at 10 μ M ($p = 0.0098$) and 100 μ M ($p = 0.0098$) doses. An anti-migratory activity was assessed when the miglustat could stop the migration of glioma cells in 24 hour healing wound assay. Thus, miglustat was shown to be effective in inhibiting proinflammatory cytokines, altering T-cell populations and preventing migration of glioma cells. Thus, miglustat proved to be effective in inhibiting pro-inflammatory cytokines, inhibiting migration, altering T cell populations and inhibiting the granzyme B production by TCD4+ and TCD8+ lymphocytes.

Keywords: Drug repositioning, glycosphingolipids, inflammation, cancer, n-butyl-deoxynojirimycin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - PAPEL ANTITUMORAL E PRÓ-TUMORAL DOS LINFÓCITOS T E O EFEITO DUAL DAS CITOCINAS IFN-γ E IL-17A.....	21
FIGURA 2 - ESTRUTURA DA PORÇÃO CERAMIDA (A). ESTRUTURA DO GLICOESFINGOLIPÍDIO GALACTOSILCERAMIDA, ONDE A REGIÃO APOLAR SE LIGA AO AÇÚCAR GALACTOSE (B).....	25
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DO MIGLUSTATO.....	28
FIGURA 4 - PROCESSO DE GLICOSILAÇÃO PELA UDP-GLICOSE, ONDE O AÇÚCAR GLICOSE É ADICIONADO A PORÇÃO HIDROFÍLICA DA CERAMIDA.....	29
FIGURA 5 - NÍVEIS DAS CITOCINAS IFN-γ (A) E IL-17A (B) EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE ESLENÓCITOS TRATADOS COM MIGLUSTATO.....	37
FIGURA 6 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE IL-6 EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE ESLENÓCITOS TRATADOS COM MIGLUSTATO.....	37
FIGURA 7 - ENSAIO DE MIGRAÇÃO COM MIGLUSTATO À 10 μM E 100 μM EM CÉLULA TUMORAL NG-97.....	38
FIGURA 8 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS B CD20⁺ ADQUIRIDAS A PARTIR DE IMUNOFENOTIPAGEM DA CULTURA DE PBMC (N = 6) TRATADA COM MIGLUSTATO A 10 E 100 μM.....	39
FIGURA 9- RAZÃO ENTRE CÉLULAS CD4 E CD8 EM CULTURA DE PBMC TRATADA COM MIGLUSTATO.....	39
FIGURA 10 - IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS NK.....	40
FIGURA 11- IMUNOFENOTIPAGEM PARA GRANZIMA B DE LINFÓCITOS TCD4⁺ E TCD8⁺.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FÁRMACOS REPOSICIONADOS EM USO EM CLÍNICA E EM TESTES PRÉ-CLÍNICOS	17
TABELA 2 - VIABILIDADE DOS PBMC	35
TABELA 3 - VIABILIDADE DOS ESLENÓCITOS DE BALB/C	35

LISTA DE ABREVIÇÕES

NB-DNJ	-N-butil-deoxinojirimicina
GSL	-Glicosfingolipídio
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
HIV	-Vírus da imunodeficiência adquirida
MM	-Mieloma Múltiplo
AMPK	-Proteína quinase amp ativada
EGF	-Fator de crescimento epidermal
D-PDMP	-D- threo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol
UDP-glicose	-N-acilesfingosina glicosiltransferase
GlcCer	-Glicosilceramida
RANKL	-Receptor de ativação do ligante de NF-kappaB
M-CSF	-Fator de estimulação de colônia dos macrófagos
INF-γ	-Interferon gama
IL-6	-Interleucina - 6
IL-17A	-Interleucina - 17A
ENA-78	-Proteína de ativação de neutrófilos epiteliais 78
TNF-α	-Fator de necrose tumoral alfa
GM-CSF	-Fator estimulante de colônias de macrófagos de granulócitos
G-CSF	-Fator estimulante de colônias de granulócitos
IDO	-Indoleamina 2,3-dioxigenase
CTL	-Linfócito T citotóxico
NK	-Célula natural killer
MTT	-Sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
MHC	-Complexo principal de histocompatibilidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 JUSTIFICATIVA.....	14
1.2 OBJETIVOS.....	15
1.2.1 Objetivo geral.....	15
1.2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS.....	16
3.2 IMUNOMODULAÇÃO.....	20
3.3 GLICOESFINGOLIPÍDIOS.....	24
3.4 ZAVESCA-MIGLUSTATO®.....	27
5 METODOLOGIA	31
5.1 CULTIVO DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS.....	31
5.2 OBTENÇÃO DE CÉLULAS PBMC PARA REALIZAÇÃO DA CULTURA CELULAR.....	31
5.3 OBTENÇÃO DE CAMUNDONGOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E PARA O TESTE DE CITOTOXIDADE EM ESPLÊNOCITOS.....	32
5.4 CULTURA DOS ESPLÊNOCITOS DE BALB/C.....	32
5.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM CÉLULAS NÃO TRANSFORMADAS E CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS TUMORAIS: MTT.....	32
5.6 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS.....	33
5.7 ENSAIO DE MIGRAÇÃO.....	33
5.8 IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS B.....	34
5.9 MARCAÇÃO INTRACELULAR DE GRANZIMA B E CÉLULAS T E NK.....	34
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
6 RESULTADOS	34
6.1 ENSAIO DE SELETIVIDADE EM CÉLULAS NORMAIS.....	34
6.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS TUMORAIS.....	35
6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO MIGLUSTATO.....	35
6.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO COM O MIGLUSTATO.....	38
6.5 IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS B.....	38
6.6 MODIFICAÇÃO DA RAZÃO CD4/CD8.....	39
6.7 EFEITO DO MIGLUSTATO NA POPULAÇÃO DE CÉLULAS NK.....	40

6.8 EFEITO DO MIGLUSTATO NA PRODUÇÃO DE GRANZIMA B	40
7 DISCUSSÃO	42
8 CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXO A – ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO. QUALIS FARMÁCIA (A1)	54
ANEXO B – TRABALHO COMPLETO APRESENTADO NO ENCONTRO BRASILEIRO PARA INOVAÇÃO TERAPÊUTICA	55

1 INTRODUÇÃO

Câncer, também denominado de neoplasia ou tumor maligno é uma doença que pode acometer virtualmente qualquer tecido. As transformações malignas levam ao crescimento e proliferação celular, destruição das células dos tecidos adjacentes, invasão, e possível migração e estabelecimento das células transformadas para diferentes tecidos do organismo que caracteriza o processo de metástase. No último caso, podem levar o indivíduo ao óbito (INCA, 2009). O tratamento do câncer é considerado complexo, pois exige a atuação de uma equipe multidisciplinar, utilizando-se de várias modalidades terapêuticas tais como a cirurgia, quimioterapia, radioterapia e transplante de medula (FONTES et al., 2014).

A síntese de novas substâncias a 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). O tempo e o custo para inserir novas moléculas no mercado é muito alto, tornando-se um paradigma no combate a doenças de rápido crescimento (CHONG & SULLIVAN JUNIOR, 2007).

Nesse contexto, a indústria farmacêutica tem 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). Os GSL encontram-se alterados e desempenham funções primordiais no câncer, que vão desde adesão celular, a angiogênese e migração, tornando essas estruturas alvos excelentes e promissores no combate a essa doença (HELENIUS; AEBI, 2001; SHRIVER et al., 2004).

Uma estratégia utilizada na terapia contra o câncer e contra doenças inflamatórias, é com as citocinas. Citocinas pró-inflamatórias desempenham papéis fundamentais na defesa do organismo contra infecções e na vigilância e combate ao câncer, além de regular ciclo celular e apoptose, ativar células importantes do sistema imune, e recrutar através de quimiocinas células

efetoras como linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ para sítios de inflamação, onde estes terão a capacidade específica de destruir o alvo. É mostrado na literatura que algumas dessas citocinas como o IFN- γ e a IL-17A possuem um papel dual, onde além de promover proteção, elas promovem evasão, instalação e progressão de células neoplásicas, mostrando-se bons alvos para pesquisas na tentativa de se buscar alternativas de tratamento a essa doença (OSTRAND-ROSENBERG et al., 2009; ZAIDI et al., 2011; SILVA-SANTOS et al., 2015).

1.1 JUSTIFICATIVA

A busca por novos mecanismos de combate ao câncer tem levado os pesquisadores a procurar por novos fármacos com maior efetividade e com menor grau de citotoxicidade para as células normais, devido aos elevados efeitos colaterais que os medicamentos já disponíveis apresentam. Desde os anos 2000 a indústria farmacêutica e a academia vêm mostrando a importância do reposicionamento de fármacos. Trata-se de uma abordagem inovadora e original, onde pode-se observar através dos efeitos colaterais das drogas, novas aplicações terapêuticas para medicamentos clinicamente já usados. Economicamente sabe-se que essa estratégia no processo de inovação é bastante viável e vantajosa, visto o conhecimento da segurança de um produto que já foi inserido no mercado para indicação do uso em clínica.

Os custos para o desenvolvimento de novos fármacos, o *screening* de moléculas bioativas e a otimização do protótipo são etapas que custam em torno de 230 milhões de dólares por droga aprovada. Logo, nessa perspectiva de inovação farmacêutica, o tempo, o custo e a segurança são os principais motivos para a estratégia de reutilização dos medicamentos já existentes.

Este trabalho visa elucidar os mecanismos imunomoduladores, citotóxicos e antimigratórios do já aprovado na clínica para doença de gaucher Zavesca (Miglustato). Encontrar novas estratégias no combate ao câncer e a doenças inflamatórias são buscas constantes e dispendiosas, e o reposicionamento de fármacos mostra-se uma ferramenta útil e de baixo custo para estas finalidades.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a atividade antineoplásica e imunomoduladora do Zavesca® (Miglustato).

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Testar o efeito citotóxico do miglustato frente às linhagens normais de esplenócitos de camundongos e células mononucleadas do sangue periférico (PMBC);
- b) Investigar a atividade citotóxica do miglustato em diferentes linhagens neoplásicas;
- c) Avaliar os efeitos imunomoduladores do composto nas citocinas IFN- γ , IL6 e IL-17A;
- d) Avaliar efeito antimigratório do miglustato na linhagem neoplásica NG-97;
- e) Identificar os efeitos do composto sob os fenótipos de linfócitos e células NK.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

Para o *Food and Drug Administration* (FDA) o reposicionamento de fármacos é uma estratégia na qual drogas já aprovadas para utilização clínica com seus efeitos colaterais conhecidos mostram potencial de sucesso no tratamento de outras doenças (HUANG et al., 2016). Novas estratégias ao combate das neoplasias têm sido aplicadas as pesquisas no desenvolvimento de futuros fármacos com propriedade anticancerígena. Todavia, a síntese de novas substâncias a serem testadas na investigação por novos medicamentos, passou a ser bastante dispendiosa, visto o pequeno número de novos compostos que vencem as etapas pré-clínicas e clínicas do desenvolvimento dos fármacos (VIEGAS JR & BOLZANI, 2006). Frequentemente, o tempo e o custo para a inserção de uma nova molécula no mercado são extremamente altos, tornando-se um paradigma para combater doenças em rápido crescimento (CHONG & SULLIVAN JR, 2007).

Neste contexto, a indústria farmacêutica tem redirecionado novas pesquisas para medicamentos existentes no mercado, com o objetivo de identificar novos empregos, baseando-se no fato de existirem o conhecimento dos perfis farmacocinéticos e de segurança desses fármacos. Ademais, o estudo dessas drogas utilizadas no tratamento de outras doenças, permite a redução total de custo de aproximadamente 40%, eliminando grande parte das avaliações toxicológicas e farmacocinéticas (CHONG & SULLIVAN JR, 2007).

Alguns fármacos já reposicionados obtiveram sucesso na clínica, como o imatinib que é originalmente usado para tratar Leucemia Mieloide Crônica e revolucionou o tratamento de tumores estromais gastrointestinais (SAPONARA et al., 2014). Também o Plerixafor usado anteriormente para tratamento de HIV, é utilizado como mobilizador de células tronco hematopoiéticas, para tratamento de mieloma múltiplo (MM). O Minalcipran foi desenvolvido como antidepressivo e hoje é utilizado como tratamento para fibromialgia (SLEIGH e BARTON, 2010). Bastante consumida nos Estados Unidos, a aspirina pode ser utilizada para prevenir metástases distantes em alguns tipos de câncer (Rothwell et al., 2012). A tabela 1 mostra fármacos com o seu uso original e seu novo emprego, através do reposicionamento.

Tabela 1- Fármacos reposicionados em uso em clínica e em testes pré-clínicos.

Fármaco	Uso original	Novo Uso	Referência
Nitazoxanida	Infecções por <i>C. parvum</i> e <i>Giardia</i>	Tratamento da tuberculose; anti-leishmania	Oldfield (2010)
Aprepitant	Náusea: receptor antagonista de neurocinina 1 (NK-1)	Cryptosporidiose em imunocomprometidos; infecção resistente de hiv-1	Manak et al., (2010); Wang et al., (2007)
Amiodarona	Antiarrítmico classe III	Doença de chagas	Oldfield (2010)
Dapoxetina	Analgésico e antidepressivo	Ejaculação precoce	Ashburn & Thor (2004)
Milnacipran	Antidepressivo	Fibromialgia	Ashburn & Thor (2004)
Clorpromazina	Antihistamínico	Tranquilizante	Ashburn & Thor (2004)
Galantamina	Anestésico	Alzheimer	Ashburn & Thor (2004)
Tamoxifeno	Anti-estrogênio	<i>Anti-Leishmania amazonensis</i>	Ashburn & Thor (2004)
Trimetrexato	Antifolato usado em infecções de <i>P. carinii</i> em pacientes com HIV	Inibidor da dhfr de <i>T. cruzi</i>	Ekins et al., (2011)
Finasterida	Hiperplasia da próstata	Perda de cabelo	Ashburn & Thor (2004)
Raloxifeno	Antiestrogênio	Osteoporose	Ashburn & Thor (2004)
Riluzol	Esclerose amiotrófica lateral	Testes clínicos para tratamento de melanoma	Ekins et al., (2011)
Sertralina	Antidepressivo	Neuroprotetor em atrofia cerebral	Peng et al., (2008)
Itraconazol	Antifúngico	Inibidor de angiogênese	Chong et al., (2007)
Acrisorcina	Antifúngico	<i>Anti-Plasmodium falciparum</i>	Shahinas et al., (2010)
Harmina	Antitumoral	<i>Anti-Plasmodium falciparum</i>	Shahinas et al., (2010)
Acetofenazina	Antipsicótico	Antagonista de receptor de androgênio humano	Ekins et al., (2011)

Fonte: Ferreira (2014)

Estudos *in vitro* com a metformina utilizada para diabetes tipo 2, mostra a eficácia no combate ao câncer de ovário. Foi descoberto que o fármaco tem a capacidade de induzir apoptose de forma independente de proteína cinase AMP ativada (AMPK), nas linhagens OVCAR-3 e OVCAR-4, provocando também arrasto no ciclo celular nas fases S e G2/M. A metformina causa apoptose ativando as caspases 3/7, diminuindo a expressão dos genes Bcl-2 e Bcl-xL que são genes que quando alterados no câncer, estão envolvidos com a supressão da apoptose em células tumorais, deixando-as mais resistentes, e aumentou a expressão de Bax e Bad, que são proteínas envolvidas nos processos de apoptose (Yasmeen et al., 2011).

Os receptores de membrana P2X7/P2X4 estão envolvidos com desenvolvimento tumoral e metástase. O reposicionamento do anti-parasitário *Ivermectin*, modula de forma alostérica os receptores P2X4, conseguindo mudar o balanço dos fatores pró tumorais, e funções citotóxicas da sinalização purinérgica das células de câncer de mama (Draganov et al., 2015).

As classes de drogas dos bifosfonatos são amplamente utilizadas na clínica para osteoporose e doença metastática dos ossos (RUSSEL, 2011; WILSON et al., 2012). Stachnik et al., (2014) mostraram que essa classe de drogas tem o receptor HER-1 como alvo, diminuindo a viabilidade de células de câncer que se beneficiam deste receptor, como câncer de mama e cólon. Outros alvos de estudo para reposicionamento são a forma ativa da vitamina D, 1,25-dihidroxitamina D [1,25(OH)2D], e seus análogos, por apresentarem efeitos antineoplásicos *in vitro* como inibição de angiogênese, proliferação, migração e invasão, além de promover apoptose nas células tumorais (LEYSSENS et al, 2013).

Huang et al., (2015) mostraram que o fármaco usado para hipertensão mibefradil, por ser um inibidor de canal de Ca⁺⁺ tipo-T, foi eficiente na redução do desenvolvimento tumoral de células de leucemia, através de um efeito dual; parada na fase G1/S e, redução da fosforilação de ERK1/2, devido à apoptose parcialmente dependente do Ca⁺⁺ do retículo endoplasmático em linhagem MOLT-4.

Pimozide, um agente neuroléptico foi capaz de inibir o desenvolvimento das células tronco tumorais e tumorigenicidade do carcinoma hepatocelular. O agente inibiu a proliferação e a formação de esferas em cultivo 3D induzindo o arrasto no ciclo celular na fase G0/G1, inibindo também o efeito migratório. Na tumorigenicidade, pimozide inibiu a formação das *side populations* de células tronco tumorais, que são a principal fonte de manutenção do carcinoma hepatocelular (CHEN et al., 2015).

Disulfiram é uma droga bastante usada no controle de alcoolismo e mostrou eficácia no tratamento de glioblastoma resistente ao fármaco padrão temozolomida. Através de ensaios de crescimento de neuroesferas, que é uma forma de cultura 3d específica para esse tipo de

linhagem, foi observado inibição de 100% da renovação das esferas. O agente também inibiu a auto-renovação em linhagens de células primárias de glioblastoma BT74 e GMB4 (TRISCOTT, et al., 2012).

Com a necessidade de se descobrir novos fármacos para serem implementados na clínica, novas estratégias são utilizadas tentando otimizar o tempo, e o número de moléculas a serem inseridas no mercado através do reposicionamento (CHONG & SULLIVAN JÚNIOR, 2007). Reforçando essa ideia, Wittmann e colaboradores (2015), utilizaram o método *in vivo* de indução química (ChIn) em larvas de peixe zebra como ferramenta de triagem de moléculas das farmacopeias mundiais para encontrar possíveis candidatos a imunomoduladores. O estudo deu enfoque aos anti-inflamatórios, cuja necessidade atual é grande, devido aos atuais possuírem efeitos colaterais indesejados quando usados a longo prazo como imunodeficiência, osteoporose e hiperglicemia (SCHÄCKE et al., 2002).

No mesmo estudo, Wittmann e colaboradores (2015), encontram 70 candidatos a anti-inflamatórios, representando 13 classes diferentes de drogas de acordo com a função e uso em clínica, partindo de uma biblioteca de 1120 compostos. Os pesquisadores destacaram no estudo o efeito pró-inflamatório do óxido nítrico, que foi descrito como potencial agente atraente de leucócitos, onde dão enfoque ao 3-Bromo-7-nitroindazol (3Br-7NI), que conseguiu inibir a produção do óxido nítrico, mostrando efeito anti-inflamatório conseguindo bloquear o recrutamento dos leucócitos no modelo *in vivo* utilizando as larvas de peixe zebra.

Outros estudos trazem drogas utilizadas para o tratamento de outras doenças, sendo reposicionadas para inflamação como mostra Pereira, et al., (2014). No seu estudo *in vitro*, ele traz como forma de inovação o reposicionamento da sinvastatina, usada para tratamento de dislipidemias. O composto conseguiu a inibição significativa, de forma dose dependente, de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-6 e IL-17A.

Seguindo os estudos de reposicionamento das estatinas para efeitos imunomoduladores, Blaschke e colaboradores (2009), através de estudos *in vitro* mostram potencial efeito anti-inflamatório da atorvastatina. Eles obtiveram diminuição das concentrações da citocina IFN- γ , e de linfócitos TCD4+ no sobrenadante de culturas de células T de pacientes com artrite reumatoide tratadas com este composto. Com o mesmo raciocínio, outros estudos mostram o aumento das células T reguladoras, e de sua capacidade imunossupressora em cultura tratada com a atorvastatina, diferente de cultura não tratada com o composto (Chalubinski et al., 2010; Tang et al., 2011).

Na ideia de reposicionamento, os inibidores da enzima de histona desacetilase vem surgindo como um forte candidato a anti-inflamatórios. No estudo *in vivo*, Rink-Jan Lohman et

al., (2016) mostram a eficácia do vorinostato, utilizando modelo para artrite e colite, na supressão dos mediadores inflamatórios IL-6 e IL-12p40, secretadas por macrófagos induzidos por lipopolissacáridos (LPS).

Para tratamento de leishmaniose visceral foram reposicionados fármacos como a pentamidina e anfotericina B, que antes eram usados para tratamento de infecções fúngicas (CROFT et al., 2006), e também da miltefosina, anteriormente utilizado para tratamento de câncer de mama (SUNDAR et al., 2002).

Estudo recente mostra a eficácia, através do reposicionamento, da bromocriptina, usada para o tratamento do mal de Parkinson, contra o vírus da zika. O estudo *in vitro* mostra que o fármaco é capaz de inibir a replicação viral e seus efeitos citopáticos, através da inibição de proteases importantes para o desenvolvimento viral (CHAN., et al 2017). A implementação da reposição de fármacos em larga escala, mostra uma oportunidade de explorar as farmacopeias existentes, dando início a uma situação que irá gerar benefícios para o setor público, privado e para a sociedade (PADHY & GUPTA, 2011).

3.2 IMUNOMODULAÇÃO

Imunomodulação pode ser compreendida pela supressão, ou potencialização de elementos da resposta imunológica. Seguindo essa linha, estudos com citocinas e quimiocinas são conduzidos na expectativa de que essas substâncias possam auxiliar no tratamento de doenças como câncer, e doenças inflamatórias (FISHER., et al 2008).

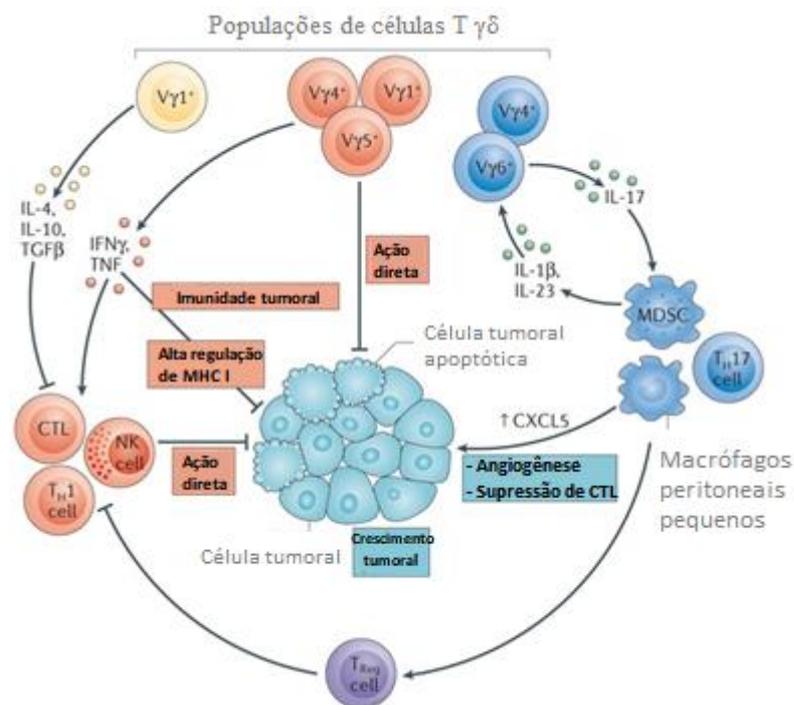
O IFN- γ é conhecido por ser uma citocina envolvida na comunicação entre a imunidade inata e adquirida, é produzida por células T, células *natural killers* (NK), e algumas células apresentadoras de antígenos. Desempenha papel importante na defesa contra bactérias e vírus, e na vigilância contra tumores (PESTKA et al., 2004). Outros papéis são descritos como regulador do sistema imune, ciclo celular, apoptose e na inflamação. O mecanismo mais elucidado de função desta citocina é na regulação positiva da expressão do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I, e na apresentação de antígenos pelas células apresentadoras antígenos profissionais (SCHRODER et al., 2004; SELIGER et al., 2008).

O IFN- γ tem relação direta com a resposta do tipo Th1, estimulando ativação e diferenciação de células T, e inibindo a resposta Th2, atuando também no desenvolvimento das células T reguladoras (Treg) (AGNELLO et al., 2003). Esta citocina também promove o

recrutamento dos macrófagos e induz a produção de quimiocinas, que vão recrutar células efetoras para o local da inflamação (HU et al., 2008).

Da mesma forma que esta citocina tem um caráter inflamatório, na sua cascata de sinalização existe também um papel inverso, em que o IFN- γ é capaz de recrutar células do sistema imune como macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos (CTLs) com a capacidade de reparação e remodelação tecidual, dando uma proteção para células adjacentes ao sítio de inflamação (Figura 1). Esta capacidade anti-inflamatória é discutida como um lado pró-oncogênico desta citocina, uma vez que células neoplásicas podem se utilizar deste artifício como maneira de escape a vigilância tumoral (ZAIDI et al, 2011).

Figura 1- Papel antitumoral e pró-tumoral dos linfócitos T e o efeito dual das citocinas IFN- γ e IL-17A.



Fonte: Adaptado de BRUNO SILVA-SANTOS et al, (2015)

As células NK e as células T são fundamentais para o escape da vigilância tumoral. Já foi mostrado que sua inibição, pode se dar por mecanismos imunossupressores, onde o IFN- γ pode desempenhar um papel importante (Figura 1). Esta citocina aumenta o desenvolvimento de Tregs fazendo com que haja uma inibição dos CTLs pela indução da expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) em células de melanoma (KATZ et al., 2008;

PRENDERGAST et al., 2008; BRODY et al., 2009). IFN- γ também tem a capacidade de atenuar a infiltração de neutrófilos e células mielóides no microambiente tumoral (IRMLER et al., 2007). Células supressoras derivadas de linhagens monocíticas e granulocíticas são dependentes de ativação por IFN- γ e são encontradas no microambiente neoplásico, fazendo com que haja inibição da resposta imunológica por células T (OSTRAND-ROSENBERG et al., 2009).

Da mesma maneira que o IFN- γ , outra citocina importante fisiologicamente para inflamação é a interleucina 17A (IL-17A). Antes pensava-se que era apenas produzida pelas células T *helpers* 17 (Th17), mas atualmente sabe-se que outras células como macrófagos, células dendríticas, células *natural killers* T (NKT), linfócitos TCD8⁺, células T reguladoras, mastócitos entre outras também a produzem. Esta citocina participa tanto da resposta imune inata, quanto na adquirida, além de participar de repostas a infecções virais e bacterianas, doenças autoimunes e câncer (QIAN et al., 2015).

No câncer é conhecido seu efeito pró angiogênese, e colaborador para evasão do tumor as células imunes (Figura 1). Existe um efeito antitumoral desta citocina, onde ela estimula o recrutamento de células NK, ativação de linfócitos T citotóxicos (CTLs), e recrutamento de neutrófilos, NK, e células CD4⁺ para o ambiente tumoral (QIAN et al., 2015).

Outra citocina que tem mostrado papel importante em diversos processos biológicos é a interleucina 6 (IL-6). Sabe-se do seu envolvimento em processos inflamatórios, anti-inflamatórios, de reparação e ainda em processos neurais (Scheller et al., 2011). Sua via de sinalização começa com a ligação com o receptor de membrana IL-6/IL-6R, onde posteriormente formará um homodímero com a glicoproteína 130 (gp130) dando início a sinalização (MÜLLBERG et al., 2000).

Alguns autores mostram em seus estudos que a IL-6 participa de forma fundamental da transição da imunidade inata, para a imunidade adquirida. Esta citocina ajuda a ação das quimiocinas que são liberadas pelas células endoteliais, na sinalização para os neutrófilos na fase inicial da inflamação. Após a invasão dos neutrófilos, mudanças no receptor da citocina fazem com que a sinalização mude nas células dos tecidos, fazendo com que ocorra uma mudança no perfil da resposta, onde a expressão de quimiocinas atraentes de neutrófilos (CXCL1/Gro α , CXCL8/IL-8, CX3CL1/fractalcina) parem de ser produzidas, e quimiocinas atraentes de monócitos (CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2, CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2), comecem a ser liberadas para que ocorra essa mudança do perfil de células no local de inflamação (ROMANO et al., 1997; HURST et al., 2001; KAPLANSKI et al., 2003; S.A. JONES, 2005).

Foi descoberto que a citocina IL-6 pode inibir o processo de diferenciação da célula TCD4⁺ naive em Treg mediada por TGFβ, inibindo autoimunidade, e protegendo contra danos teciduais. Outro estudo mostrou que a combinação da IL-6 com TGF-β, induziu a diferenciação de células T com o fenótipo de células Th17, que são uma das responsáveis por liberar citocina TH17, que está relacionada com o recrutamento das células responsáveis pelas doenças autoimunes (BETTELLI et al., 2006; MANGAN et al., 2006).

A resposta inflamatória mediada por células T é um processo adaptativo onde essas células desenvolvem antígenos específicos para combater infecções virais, bactérias, fungos e células tumorais. A forma de ativação é via o receptor de células T (TCR), juntamente com os co-receptores CD4 ou CD8, com os quais as células apresentadoras de antígenos (APCs) interagem através de moléculas de MHC. As células T depois de ativadas rapidamente se proliferam através de expansão clonal, e migram para onde estão os antígenos aos quais elas foram apresentadas. (BROERE et al., 2011).

No local da inflamação, células T efectoras desempenham papéis diferentes. Através da indução por IL-2, o fenótipo TCD8⁺ possui uma característica citotóxica, sendo bastante efetivo na lise direta de células infectadas com o antígeno, ou contra células malignas. Através do contanto com a célula, e do reconhecimento do antígeno, seus grânulos de granzimas e perforinas citolíticas são lançados para destruição da célula alvo (SILVA-SANTOS et al., 2015).

Outro tipo de linfócito T efector é o TCD4⁺. Essa célula é caracterizada pelo tipo de citocina que produz em dois fenótipos principais, a Th1, e Th2, tendo ainda outros tipos celulares como Th17, Treg, Th9, Th22. O Th1 é conhecido por liberar citocinas inflamatórias como principalmente IFN-γ, TNF-α e IL-2 (Figura 1). Esse efeito pró-inflamatório pode acarretar hipersensibilidade, e melhora a resposta de células B em opsonizar isotipos de anticorpos da classe IgG. Células Th2 secretam citocinas IL-4, -5, -6, -10 e -13, promovendo uma resposta imune não inflamatória, mas essencial na ativação de células B para ativação de anticorpos das classes IgG, IgA e IgE (SALLUSTO et al., 2009).

Tão importante quanto as células T, as células NK são as principais células da resposta inata, da proteção contra vírus e células neoplásicas. Comprometem cerca de 15% dos linfócitos T circulantes e podem ser sub classificadas de acordo com a expressão da molécula de adesão CD56 em CD56^{bright} ou CD56^{dim}. Células NK CD56^{bright} estão localizadas nos linfonodos, não possuem potencial citotóxico e produzem citocinas após ativação, até se tornarem células CD56^{dim} maduras, onde ganham a corrente sanguínea e cerca de 90% se tornam citotóxicas. Após a maturação, essas células conseguem a habilidade de reconhecer e lisar antígenos como

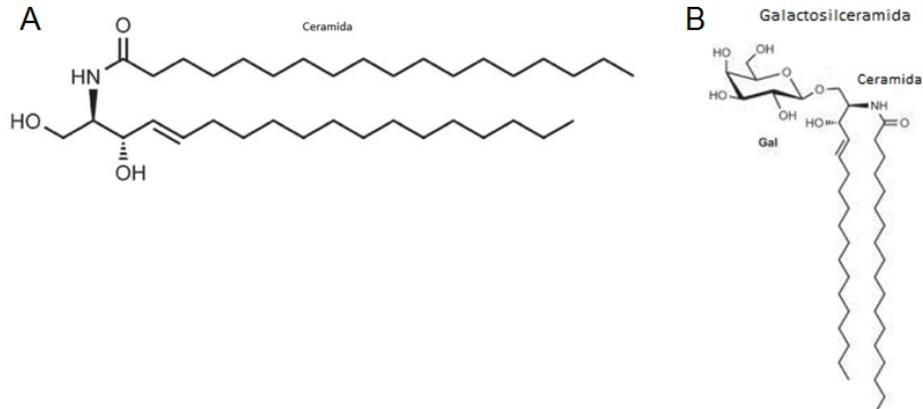
células tumorais, e participam da imunovigilância, prevenindo a propagação destas células (GOTTHARDT et al., 2017).

Com a importância da imunomodulação para o estabelecimento e progressão do câncer, o reposicionamento de fármacos que apresentam boa atividade imunomoduladora é de grande valia. Em 2015, STOLARZ et al., faz testes com fenofibrato, que é amplamente utilizado para controle de colesterol e triglicerídeos. No estudo *in vitro*, eles mostram que o fármaco tem potencial anti-inflamatório, quando eles cultivam células epiteliais humanas das vias aéreas, e células brônquicas de fibrose cística sob condições de doses desse fármaco estimuladas com a citocina pró-inflamatória IL-1 β . Eles observaram redução na produção de quimiocinas inflamatórias como: IL-8, proteína de ativação de neutrófilos epiteliais 78 (ENA-78), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulante de colônias de macrófagos de granulócitos (GM-CSF) e fator estimulante de colônia dos granulócitos (G-CSF).

3.3 GLICOESFINGOLIPÍDIOS

Os GSL são estruturas bastante heterogêneas possuindo uma cadeia de ceramida (hidrofóbica), e uma cadeia de açúcar (hidrofílica) (Figura 2A). Agrupam-se em grande quantidade formando os microdomínios na superfície da membrana plasmática (lipid rafts), onde estão acoplados com moléculas transdutoras de sinais, como proteína G e cinases da família Src (Iwabuchi et al., 2015). Já foram caracterizadas mais de 60 bases esfingoides, que são aminoalcoois alifáticos, e mais de 300 tipos de oligossacarídeos, que combinados entre si, geram milhares de tipos de GSL, como por exemplo a galactosilceramida (Figura 2B) (KARLSSON, 1970). Os GSL são encontrados em todas as membranas de células dos organismos, desde bactérias aos humanos, são os maiores constituintes dos glicanos do cérebro dos vertebrados, com mais de 80% dos gliconjugados na forma de glicolipídios (VARKI et al., 2009).

Figura 2 - Estrutura da porção ceramida (A). Estrutura do glicosíngolípido galactosilceramida, onde a região apolar se liga ao açúcar galactose (B).



Fonte: Adaptado de VARKI et al., (2009)

A interação dos glicosíngolípídios com as proteínas da membrana celular e os transdutores de sinal é denominada de glicosinapse, que é o processo no qual ocorre a comunicação via glicosíngolípídios. No microambiente tumoral, esse processo, após adesão celular, é o mediador dos GSL com as células responsáveis pelo desenvolvimento e progressão tumoral (HAKOMORI, 2003).

Os diferentes tipos de glicosilação em estruturas diferentes de ceramida dão a especificidade dos GSL nas membranas celulares, que vão influenciar na composição desses glicosíngolípídios nos microdomínios. Essa variada capacidade de composição, dá os diferentes tipos de funções, como mediador de adesão celular, antígeno, e modulador de transdução de sinal (HAKOMORI, 2003). O metabolismo e composição dos GSL estão especificamente alterados durante a fase de proliferação e diferenciação de inúmeros tipos celulares. Essa propriedade indica que essa diferenciação específica nesses padrões de GSL, reflete na função das células (HAKOMORI, 2003; SONNINO et al., 2006).

A fração ceramida tem papel fundamental na estabilização e formação dos domínios lipídicos, assim como tem papel importante nas atividades biológicas mediadas pelos GSL. Ceramida é composta por esfingosina e cadeias longas de ácido graxo. Através da hidrólise da ceramida pela ceramidase, é gerada a esfingosina e ácido graxo livre. A esfingosina é então fosforilada pela esfingosina quinase para esfingosina 1-fosfato, que está envolvida em vários processos celulares, como crescimento, diferenciação, sobrevivência, quimiotaxia, angiogênese e embriogênese. Tais características dão uma propriedade importante tanto imunológica, quanto, principalmente, inflamatório a esfingosina. (IWABUCHI et al., 2010; SNIDER et al., 2010).

Os carboidratos presentes nos glicoconjugados (glicoproteínas e glicolípidios) apresentam alto grau de complexidade e diversidade estrutural e encontram-se alterados no câncer (HELENIUS; AEBI, 2001; SHRIVER et al., 2004). A glicosilação alterada tanto via O- quanto N-glicosilação pode desempenhar importantes papéis, tais como, adesão celular, invasão, metástase e favorecimento do estabelecimento do microambiente tumoral inflamatório (VARKI, 2009; RAMBARUTH & DWEK, 2011). Um dos principais GSL, os gangliosídios, são GSL ácidos que carregam um ou mais resíduos de ácido siálico, e são mais abundantes no sistema nervoso. Acredita-se que eles têm papel no controle do crescimento celular (VARKI et al, 2009).

As células de melanoma expressam alta quantidade de gangliosídios na membrana, assim como tumores gastrointestinais. Células tumorais tem a capacidade de produzir e liberar grandes quantidades de gangliosídios com atividades imunossupressoras (VARKI et al., 2009). Tumores neuroectodérmicos são caracterizados pela presença de antígenos de GSL associados a tumores, como os gangliosídios, que são estruturas, capazes de modificar fatores tróficos, como a cascata mitogênica que esses fatores geram (BIRKLÉ, et al., 2003).

Gangliosídios associados ao tumor desempenham papel crucial no desenvolvimento invasão, e metástase tumoral, como consequência do início da transformação oncogênica, o que justifica essas moléculas serem alvos importantes das atuais pesquisas sobre câncer. São estruturas simples presentes em células normais, que através de estudos clinico-patológicos, consegue-se ver o aumento de sua expressão nos tumores (BIRKLÉ et al., 2003; YEH et al., 2016).

NeuAc2-8NeuAc2-3Gal1-4Glc-1-1Cer; CD60a (GD3) é um disialo gangliosídio, marcador de células neuroectodérmicas imaturas. Estudos tem mostrado que GD3 associado com o receptor de fator de crescimento epidermal (EGF) é importante para a manutenção da auto-renovação das células tronco neurais (GOLDMAN et al., 1984; WANG AND YU, 2013).

O GD3 é o gangliosídio mais abundante no cérebro humano, e de células de melanoma (PUKEL, et al., 1982). Células de tecidos primários, como células do melanoma estabelecido, possuem grandes quantidades de GD3 como maior componente de gangliosídio, em contraste com os melanócitos que expressam quantidades mínimas ou não expressam GD3 (CARUBIA, et al., 1984; FURUKOWA, et al., 1990). Células de melanoma com maior poder metastático possuem maior expressão de gangliosídios, especialmente o GD3, do que células com menor poder de metástase, sugerindo que GD3 possui papel crucial na transformação de melanócitos em melanoma, e na manutenção das características malignas desta neoplasia (RAVINDRANATH et al., 1991; BIRKLÉ et al., 2003).

Gangliosídios podem ser liberados do tumor para o microambiente, onde na forma de micelas, vesículas e monômeros, podem se ligar e interagir com proteínas, incluindo moléculas transdutoras de sinal do microambiente tumoral (Kong et al., 1998; Rusnati et al., 1999; Dolo et al., 2000). Pelo fato dos gangliosídios poderem ser incorporados pela membrana de células vizinhas, é possível que eles possam modular a interação célula-célula favorecendo seu desenvolvimento (LI et al., 1991; CHANG et al., 1997).

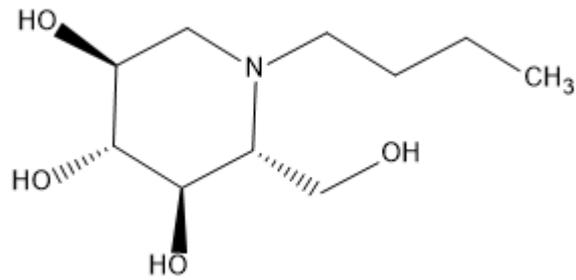
Estudo com inibidores de glicosiltransferases, enzimas que fazem parte da biossíntese dos glicolipídios, demonstrou atividade contra alguns tipos de câncer (GUERRERA et al., 2003). CHATTERJEE et al (2013) mostraram em seu trabalho que é possível diminuir a massa tumoral do câncer de rim em camundongos usando o D- threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (D-PDMP), uma molécula inibidora de glicosiltransferase. Estes autores acreditam que a redução tumoral está ligada ao bloqueio da angiogênese, devido a inibição dos glicosfingolipídios.

Desta forma, a estratégia da utilização de inibidores de glicosiltransferases pode desempenhar um papel chave no combate ao câncer, assim como na imunomodulação devido ao caráter imunológico e inflamatório da esfingosina como foi descrito por IWABUCHI et al., (2010) e SNIDER et al (2010), uma vez que a inibição da glicosilceramida pode causar alterações em moléculas inflamatórias.

3.4 ZAVESCA-MIGLUSTATO®

Zavesca-Miglustato® (N-butil-deoxinojirimicina – NB-DNJ) (Figura 3) é um iminoaçúcar atualmente usado na clínica para o tratamento da doença de Gaucher, uma esfingolipidiose caracterizada por uma deficiência específica da enzima β -glucocerebrosidase, que resulta no acúmulo anormal de glicosilceramida no lisossomo (BRIAN et al., 2013). Este acúmulo anormal de glicosilceramida promove uma disfunção celular com a observação de um aumento no volume do fígado e baço bem como anormalidades na medula espinhal, causando neurodegeneração progressiva e morte ainda na infância (MELO & CARVALHO, 2006). O mecanismo de ação do Zavesca-Miglustato® baseia-se na privação de substrato. Este iminoaçúcar é análogo de D-glucose, e atua inibindo glicosilceramida sintase (ABE et al., 2001; BUTTERS et al., 2005), enzima responsável pelo primeiro passo na síntese da maioria dos GSL (TIRELLI, 2005).

Figura 3 - Estrutura química do miglustato.

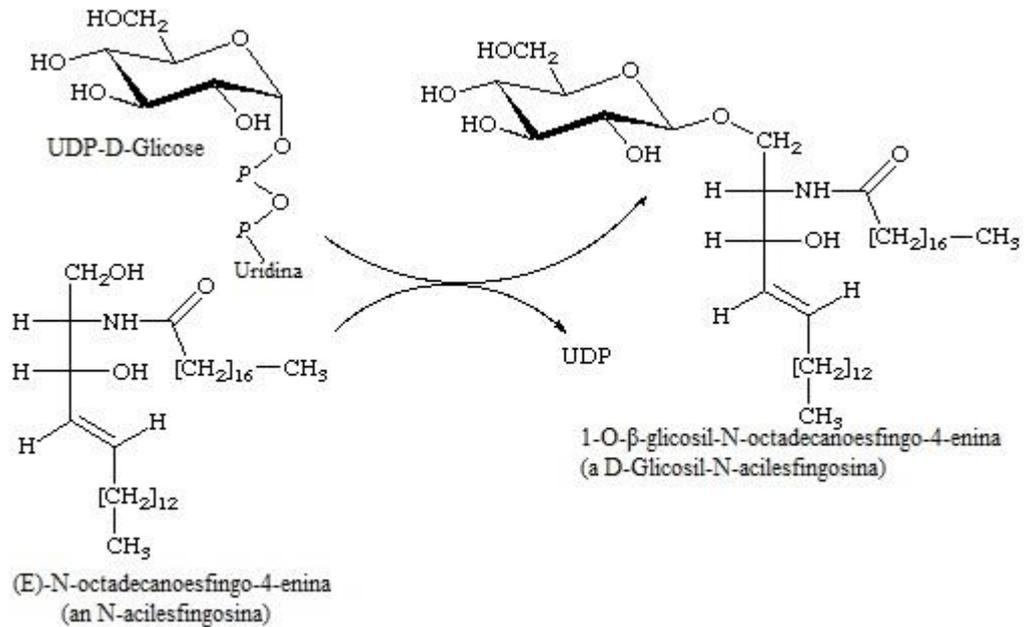


Fonte: O autor(2016)

O miglustato e seus derivados alquilados tem a capacidade de inibir o processamento dos oligossacarídeos N-ligados a enzimas α -glicosidases I e II. Como são compostos análogos da glicose, eles podem inibir tanto glicosidases quanto glicosiltransferases, resultando na inibição da biossíntese de todos os GSL que são baseados em glicosilceramida (PLATT et al., 1994).

O miglustato possui baixo grau de toxicidade em células normais. Foi observado que com IC-50 de 20 μ M para inibição da síntese de glicosilceramida (GlcCer), não causa acúmulo de ceramida, não causa apoptose, e não possui citotoxicidade em concentrações em mM (PLATT et al., 1994; BIEBERICH et al., 1999). A UDP-glicose: N-acilesfingosina glicosiltransferase é a transferase que tem um papel importante na geração da GlcCer, que é o precursor dos GSL e gangliosídios mais complexos (Figura 4) (KOLTER et al., 2002).

Figura 4 - Processo de glicosilação pela UDP-Glicose, onde o açúcar glicose é adicionado a porção hidrofílica da ceramida.



Adaptado de: Enzyme Database

Disponível em: www.enzyme-database.org/query.php?ec=2.4.1.80

Em linhagem de melanoma, o miglustato tem a capacidade de diminuir a produção de GlcCer, de depletar gangliosídios do tipo GM3 da superfície celular, e do microambiente tumoral sem acúmulo de ceramida, causando um atraso no desenvolvimento tumoral (GUERRERA et al., 2003). Com auxílio de lipossomas para carrear o miglustato até o citoplasma, foi observado uma diminuição nos níveis de melanina produzida pelos melanócitos (PARK et al., 2008). Em linhagens de células de neuroblastoma, o miglustato consegue a depleção de aproximadamente 85% dos gangliosídios do tipo GM1 levando ao retardo no desenvolvimento destas células (DIJKHUIS et al., 2006).

GM3 é um importante GSL no que se diz respeito à maturação e diferenciação de alguns precursores mielóides em macrófagos e monócitos (NOJIRI et al., 1986). Em função de GM3, os osteoclastos, que também vêm de um precursor mielóide, sofrem diferenciação e maturação em resposta ao *receptor activator of NF-kappaB ligand* (RANKL) e *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) (HORWOOD et al., 1998; IWAMOTO et al., 2001).

Os pacientes com mieloma múltiplo (MM) comumente desenvolvem doença osteolítica (EDWARDS et al., 2008), e o miglustato pode inibir o processo de formação dos osteoclastos, que são fundamentais na doença óssea e manutenção do MM, devido da inibição de RANKL, que é um sinal de ativação dos osteoclastos (ERSEK et al., 2015).

Em linhagens de células de câncer cerebral, EPEN e CT-2A, o miglustato teve efeito inibitório no crescimento celular, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. O fármaco reduziu 50% das células em EPEN, e 48% em CT-2A *in vitro*, sem alterar a viabilidade de células normais. Já o efeito *in vivo* foi de 55% para EPEN e 72% para CT-2A. Miglustato também mostra efeito nos gangliosídios das linhagens EPEN e CT-2A, diminuindo cerca de 56% e 39% respectivamente (RANES et al., 2001).

Outros estudos com o miglustato existem devido sua capacidade de interferir nas N-ligações dos oligossacarídeos, como o vírus HIV *in vitro*. Através da inibição das α -glicosidases I e II que alteram o processamento dos N-glicanos das glicoproteínas gp160, gp120, gp41 prejudicando a replicação, formação de sincícios e infecciosidade do vírus HIV (KARLSSON et al., 1993; FISCHER et al., 1995; VOLLENWEIDER et al., 1996). Estes resultados, mostram que o miglustato pode obter sucesso com seu reposicionamento no tratamento de patologias que envolvam glicosilação de estruturas, como o câncer.

5 METODOLOGIA

5.1 CULTIVO DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS

Foi realizado o cultivo de células das linhagens de carcinoma ductal de mama (T-47D), glioma humano (NG-97), leucemia aguda promielocítica (HL-60), adenocarcinoma de mama (MDA-MB), melanoma (SK-MEL) e leucemia mielóide crônica (K-562). Todas as células foram obtidas através do banco de células do Rio de Janeiro, mantidas a 37°C contendo 5% de CO₂ em meio RPMI 1640, exceto MDA-MB que utilizou meio L15/F12, ambas com 10% de soro fetal bovino. A troca de meio foi realizada sempre que necessário para manter a viabilidade das células.

5.2 OBTENÇÃO DE CÉLULAS PBMC PARA REALIZAÇÃO DA CULTURA CELULAR

As células mononucleares (PBMC) foram separadas do sangue periférico por meio de gradiente de densidade descontínua sobre Histopaque 1077 (Sigma Aldrich), dentro das considerações éticas. O tubo contendo o Histopaque 1077 e o sangue, foi centrifugado a 300 x g por 30 minutos a 21°C em centrífuga sem freio. Em seguida, foram aspiradas com pipeta Pasteur, as camadas contendo as células mononucleares, sendo transferidas para outro tubo *Falcon*. 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 de PMA (do inglês, *Phorbol 12-myristate 13-acetate*), e ionomicina, e para o ensaio com granzima B, estimuladas com IL-2 + PHA (do inglês *Phytohaemagglutinin*). As doses do miglustato que foram escolhidas para tratar a cultura foram de 5 µM, 10 µM, 50 µM e de 100 µM, e 10 µM e 100 µM para o ensaio com granzima B.

5.3 OBTENÇÃO DE CAMUNDONGOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E PARA O TESTE DE CITOTOXIDADE EM ESLENÓCITOS

Foram utilizados 11 camundongos albinos BALB/c (*Mus musculus*) fêmeas, com faixa etária de 40 dias e peso variando entre 25 e 30 g provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami – LIKA da Universidade Federal de Pernambuco. Os procedimentos com animais foram iniciados após aprovação pelo Comitê de Ética Animal – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CCB-UFPE) sob número de processo 0031/2017.

5.4 CULTURA DOS ESLENÓCITOS DE BALB/C

Após sacrifício em câmara de CO₂ os camundongos tiveram seus baços retirados e transferidos para placa de Petri contendo Meio RPMI 1640 (Gibco). As células foram desagregadas com o auxílio de uma ponteira e em seguida realizada filtração em Cell Strainer 40µm (BD Bioscience) e centrifugação a 300 G durante 10 minutos, aceleração 6, freio 4. Quando necessário, o precipitado de células foi tratado com solução RBC Lysis Buffer 1x (eBioscience) para lisar os eritrócitos presentes. Os esplenócitos foram contados em Câmara de Neubauer utilizando Azul de Trypan para determinar a viabilidade, sendo usados apenas se a viabilidade fosse superior a 95%, em seguida plaqueadas a 1×10^6 células/poço para realização de cultura com o mitógeno concanavalina A (ConA) (5µg/mL), e o metilprednisolona como fármaco referencia (100µg/mL). Um poço foi deixado apenas com células sem estímulo para controle do ensaio, sendo cultivadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após 48 horas o sobrenadante da cultura foi retirado e estocado a -30°C até a utilização para dosagem de citocinas.

5.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM CÉLULAS NÃO TRANSFORMADAS E CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS TUMORAIS: MTT

Os ensaios foram realizados utilizando PBMC (n = 2 experimentos independentes), esplenócitos de camundongos tipo BALB/c (n = 4 experimentos independentes) e as linhagens de células tumorais (n = 2 experimentos independentes para cada linhagem) descritas no item 5.1. O método MTT é uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-

tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O miglustato foi adicionado em diferentes concentrações 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M e 100 μ M, em triplicata para cada condição, e incubado por 48 horas para as PBMC e esplenócitos, e por 72 horas para as células tumorais, em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida foram adicionados 20 μ l da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. Após as 3 horas foi adicionando 130 μ l de dodecil sulfato de sódio (SDS), para completa lise das células. Após 24 horas a absorbância foi lida após dissolução do precipitado com SDS em espectrofotômetro de placa a 570 nm.

5.6 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS

As citocinas presentes no sobrenadante da cultura dos esplenócitos foram quantificadas por ELISA sanduíche (Enzyme-linked immunosorbent assay), seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores. As citocinas avaliadas foram: IFN- γ (2000/ 15,62), e IL-6 (1000/ 7,81), IL-17A (500/ 3,90). Para amostras que ficaram abaixo do limite de detecção do kit, foi utilizado o valor do ponto menos concentrado.

5.7 ENSAIO DE MIGRAÇÃO

Para avaliar o potencial efeito antimigratório dos compostos, foi utilizado o ensaio de cicatrização de ferida. As células foram plaqueadas em uma densidade de 0.5×10^4 por poço mantidas em estufa a 37° com 5% de CO₂ por 24 horas. Após isso, um risco foi feito no fundo da placa com auxílio de uma ponteira de 10 μ L estéril, para deixar um espaço aberto sem células. O meio foi trocado para lavagem das células, e os compostos foram colocados nas concentrações de 10 μ M e de 100 μ M. Na sequência sob um microscópio acoplado a um sistema de captura de imagens, fotos foram feitas no tempo inicial zero (imediatamente à adição do fármaco) e subsequentemente à 12 e 24 horas. A análise de área ocupada dos resultados foi realizada a partir do programa Image J.

5.8 IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS B

A imunofenotipagem de linfócitos B (CD20+), foi realizada por citometria de fluxo em sangue periférico. O anticorpo monoclonal utilizado foi anti-CD20. A aquisição foi realizada utilizando o FACSVerse (BD Biosciences, CA) e os dados obtidos analisados com o programa BD FACSuite™ (BD Biosciences, CA). Os valores foram expressos em percentuais.

5.9 MARCAÇÃO INTRACELULAR DE GRANZIMA B E CÉLULAS TE NK

Após a cultura das PBMC, 2×10^6 de células foram utilizadas para o protocolo de marcação intracelular para granzima B, linfócito TCD8 e células NK de acordo com o manual do fabricante. Os anti-corpos monoclonais utilizados foram anti-granzima B, anti-CD3, anti-CD8 e anti-CD56. 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.

5.10 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 $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 ENSAIO DE SELETIVIDADE EM CÉLULAS NORMAIS

O ensaio de seletividade foi realizado através do método de MTT em células normais PBMC. O composto foi primeiramente testado nas concentrações de 10, 50 e 100 μM . Como esperado, o miglustato não demonstrou qualquer efeito citotóxico, sem comprometer a

viabilidade das células, até mesmo na concentração mais alta de 100 μM como mostra a tabela a seguir:

Tabela 2 - Viabilidade dos PBMC tratados com miglustato.

Concentração (μM)	Viabilidade (%)	Desvio Padrão
10	83,93835	8,565963
50	85,3433	10,943360
100	89,20326	10,822650

Fonte: O autor(2016)

6.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS TUMORAIS

O miglustato foi testado em concentrações de 5 μM , 10 μM , e 50 μM para as linhagens MDA-MB, T47-D e HL-60, e nas concentrações de 10 μM , 50 μM , e 100 μM para as linhagens k-562, SK-MEL e NG-97. O composto não se apresentou citotóxico nas linhagens tumorais avaliadas.

6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO MIGLUSTATO

O miglustato posteriormente foi testado em células de esplenócitos de BALB/c nas concentrações de 10 μM , 50 μM , 100 μM , adicionando nesse ensaio uma dose superior de 500 μM afim de testar o efeito citotóxico em uma concentração maior, uma vez que nas células de PBMC na dose maior de 100 μM não houve efeito tóxico. Através do ensaio de MTT foi observado alto grau de citotoxicidade apenas na concentração de 500 μM , onde foi visto a redução da viabilidade celular como mostra a (Tabela 3). Após isso, a dose de 500 μM foi excluída por ser tóxica.

Tabela 3 - Tabela de viabilidade de esplenócitos de BALB/c tratados com miglustato.

Concentração (μM)	Viabilidade (%)	Desvio Padrão
10	100,0	5,625460
50	100,0	10,064770
100	93,960750	4,708688
500	68,809300	12,745060

Fonte: O autor(2016)

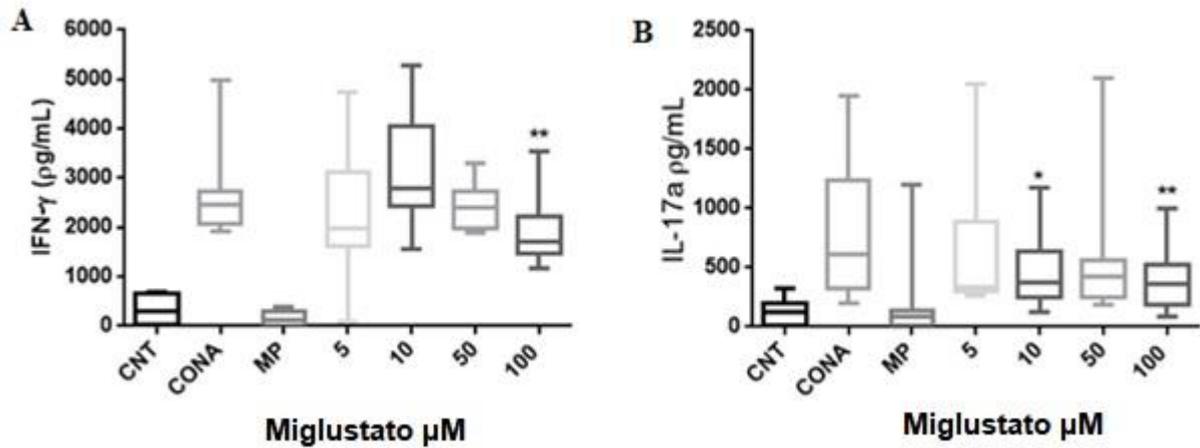
Para tratar a cultura dos esplenócitos dos BALB/c para a dosagem de citocinas, foram escolhidas as doses de 5, 10, 50 e 100 μM , uma vez que não demonstraram citotoxicidade nos ensaios com PBMC e com as células do baço dos BALB/c. A dose de 500 μM que demonstrou alto grau tóxico nas células dos esplenócitos foi excluída do ensaio. Sendo assim a cultura destas células seguiram com as doses citadas acima, para elucidar o efeito imunomodulador do miglustato.

Após o tratamento com o miglustato foi avaliada a expressão do interferon gama. Podemos observar que a modulação do composto não segue um comportamento dose resposta. A dose de 5 μM tem uma mediana [1965 pg/mL (86,3 - 4736,5)] menor que das doses de 10 e 50, apesar de não significativo. Já a dose de 100 μM [1698,0 pg/mL (1161,2 - 3530,8)] reduziu significativamente ($p = 0,0078$) os níveis de IFN- γ quando comparado com a célula estimulada [2465,0 pg/mL (1920,4 - 4988,0)] (Figura 5A).

Foi dosada também a citocina IL-17A após o tratamento com o miglustato. A modulação do composto, assim como o IFN- γ , não segue um comportamento dose resposta. Podemos observar que a dose de 5 e de 50 μM embora tenham as medianas menores que a de célula estimulada [612,4 pg/mL (204,1 - 1951,4)] não mostraram resultados significativos. Já a dose de 10 μM [374,2 pg/mL (126,6 - 1170,9)] e a dose de 100 μM [363,3 pg/mL (92,5 - 1002,6)] mostrou redução significativa da citocina quando comparadas com a célula estimulada com valores de ($p = 0,0186$) e ($p = 0,0020$) respectivamente (Figura 5B).

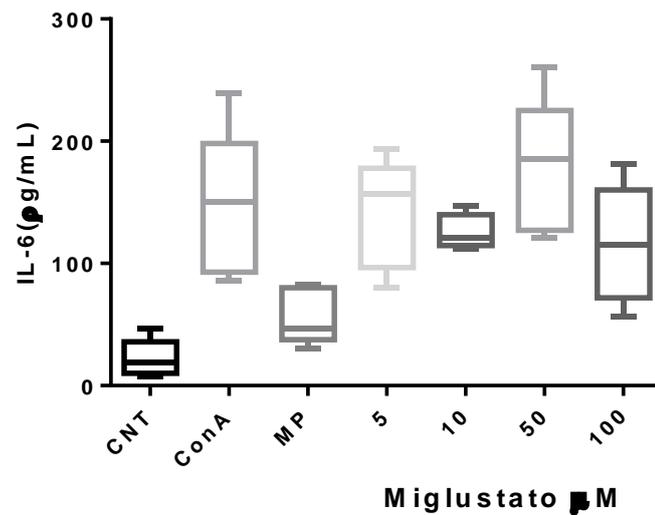
Outra citocina que foi dosada no sobrenadante de cultura dos esplenócitos dos BALB/c foi a IL-6. Apesar das medianas das doses de 10 e de 100 μM serem menores do que a mediana da célula estimulada, não houve significância nos resultados. Curiosamente na dose de 50 μM a mediana [185,1 pg/mL (121,3 - 260,1)] se mostraram maiores que a da célula estimulada [150,4 pg/mL (85,6 - 239,6)] mostrando um possível efeito pró-inflamatório do miglustato frente a essa citocina na dose de 50 μM (Figura 6).

Figura 5 - Níveis das citocinas IFN- γ (A) e IL-17A (B) em sobrenadante de cultura de esplenócitos tratados com miglustato (5, 10, 50 e 100 μ M) (n = 11). Nos gráficos apresenta-se a comparação do miglustato com os controles (CNT = Controle não tratado, ConA = Concavalina A, MP = Metilprednisolona). A redução na expressão das citocinas foi avaliada em comparação com a condição de estímulo (ConA) e o grau de significância é apresentado pelos asteriscos (*) e (**). As barras representam mediana, máximo e mínimo.



Fonte: O autor (2016)

Figura 6- Níveis de expressão de IL-6 em sobrenadante de cultura de esplenócitos tratados com miglustato (5, 10, 50 e 100 μ M) (n = 5). A redução na expressão das citocinas foi avaliada em comparação com a condição de estímulo (ConA). As barras representam mediana, máximo e mínimo.

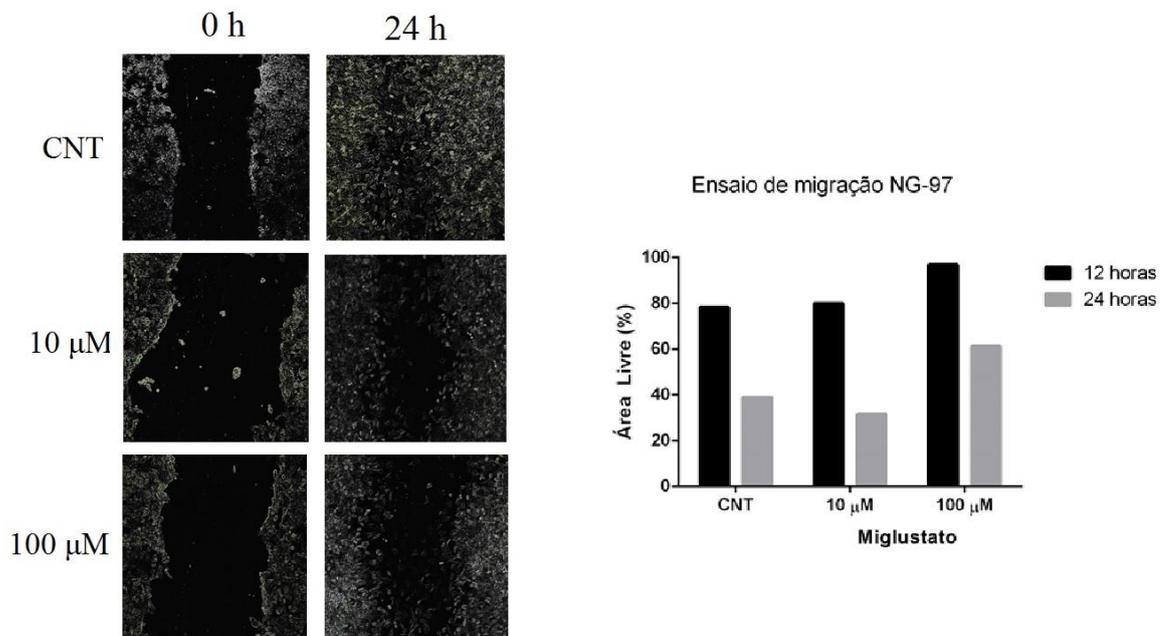


Fonte: O autor (2016)

6.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO COM O MIGLUSTATO

O ensaio de migração foi realizado nas células tumorais de glioma (NG-97) utilizando as concentrações de 10 μM e de 100 μM . Na dose de 10 μM do miglustato, o controle não tratado (CNT) teve uma área livre de células maior, 38.8% contra 31.6% da dose de 10 μM no tempo de 24 horas. Já na dose de 100 μM , foi observada uma área livre de células maior do que no controle não tratado, 61.3% contra 38.8% como mostram a (Figura 7).

Figura 7- Ensaio de migração com miglustato à 10 μM e 100 μM em célula tumoral NG-97.

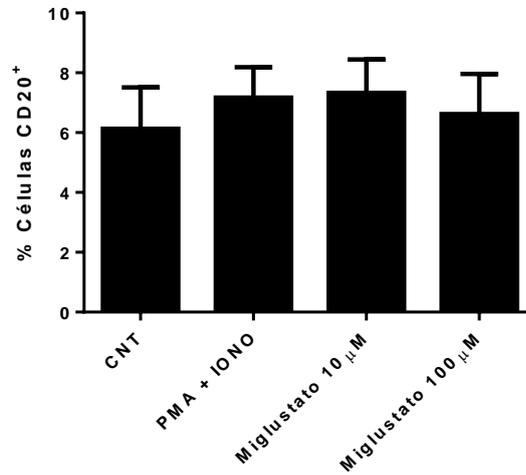


Fonte: O autor (2016)

6.5 IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS B

Para observar possíveis efeitos do miglustato sobre os linfócitos B, foi feita imunofenotipagem após a cultura de 24 horas de PMBC estimulados com PMA e ionomicina. Duas doses do composto foram escolhidas para tratar a cultura, a dose de 10 μM , e a dose de 100 μM que obtiveram resultados significantes nas dosagens de citocinas, mas não mostraram resultados significantes nas células B (Figura 8).

Figura 8 - Porcentagem de células B CD20⁺ adquiridas a partir de imunofenotipagem da cultura de PBMC (n = 6) tratada com miglustato a 10 e 100 μ M.

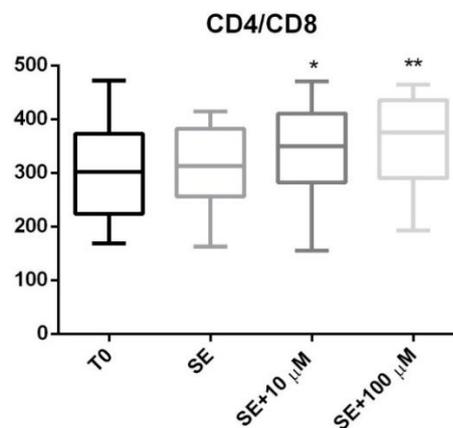


Fonte: O autor (2016)

6.6 MODIFICAÇÃO DA RAZÃO CD4/CD8

Diante da expressão de CD8⁺, o miglustato não demonstrou resultados significativos. Em adição, a relação CD4/CD8 também foi alterada nas células que foram tratadas com miglustato, (Figura 9). Na (Figura 9) pode-se observar efeito significativo do miglustato nas doses de 10 μ M (0,0371) e 100 μ M ($p = 0,002$) quando comparado a condição não tratada, modificando a razão entre CD4 e CD8.

Figura 9 - Razão entre células CD4 e CD8 em cultura de PBMC tratada com miglustato.

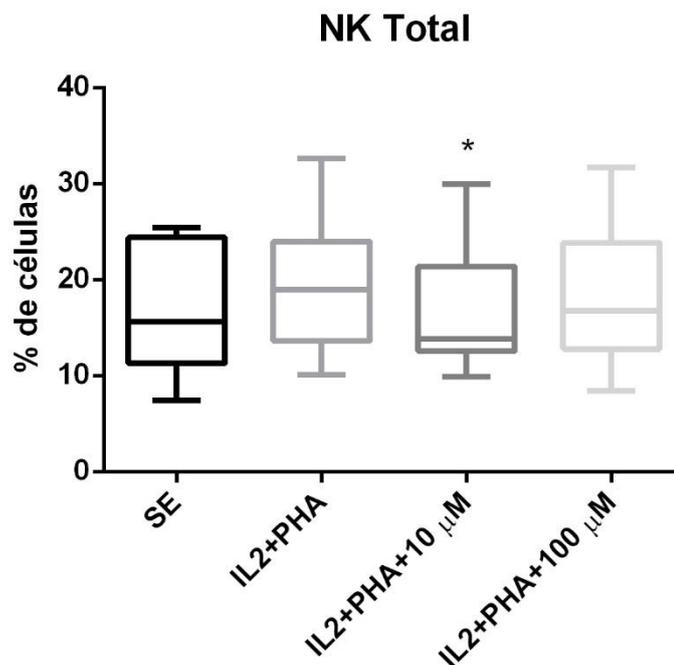


Fonte: O autor (2016)

6.7 EFEITO DO MIGLUSTATO NA POPULAÇÃO DE CÉLULAS NK

A imunofenotipagem de células NK tratadas com o miglustato mostrou um efeito inibitório significativo ($p = 0,0195$) na dose de $10 \mu\text{M}$ do composto quando comparado a condição estimulada, mostrando uma possível ação inibitória do miglustato nestas células (Figura 10).

Figura 10 - Imunofenotipagem de células NK. Cultura de PBMC ($n = 10$) tratada com miglustato à $10 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$ no tempo de 24 horas. A redução nos níveis da célula NK foi observada através da comparação entre a condição estimulada (IL2+PHA) e a condição estimulada e com miglustato a $10 \mu\text{M}$ (IL2+PHA+ $10 \mu\text{M}$). O grau de significância é dado pelo asterisco (*). As barras representam mediana, máximo e mínimo.



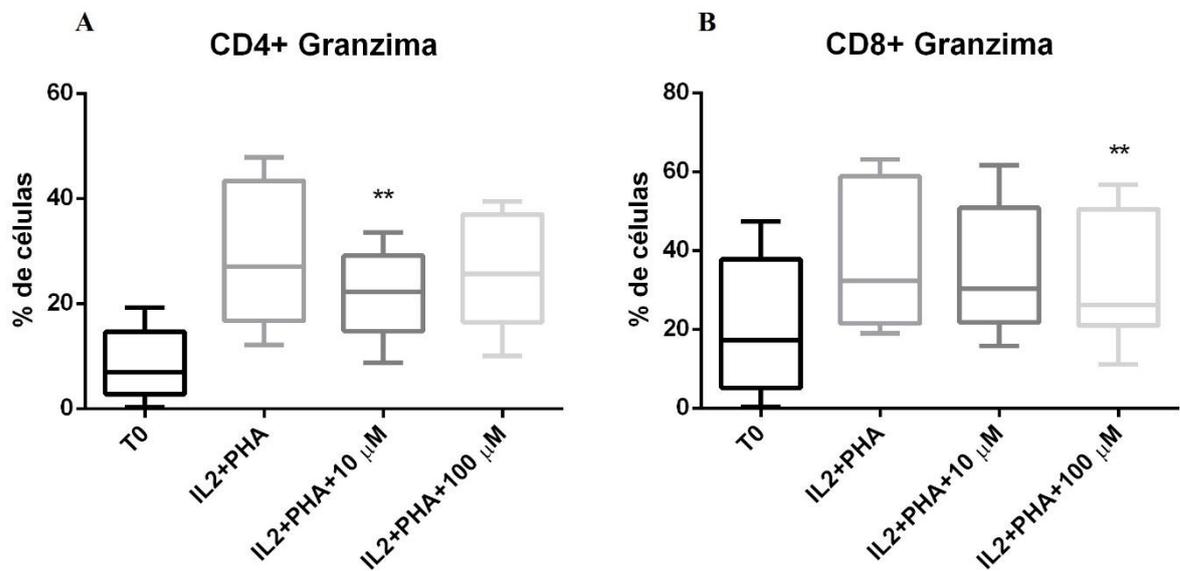
Fonte: O autor (2016)

6.8 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 $10 \mu\text{M}$

para linfócitos TCD4 ($p = 0,0098$) (Figura 11A), e na dose de 100 μM para os linfócitos TCD8 ($p = 0,0098$) (Figura 11B).

Figura 11 - 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. O grau de significância é dado pelos asteriscos (**). As barras representam mediana, máximo e mínimo.



Fonte: O autor (2016)

7 DISCUSSÃO

Na procura por novos usos para fármacos antigos, estratégia adotada e conhecida como reposicionamento de fármacos, o miglustato mostrou eficácia na inibição da migração celular em linhagem neoplásica de NG-97, na inibição de forma significativa de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A e diminuição de células importantes na patogênese de doenças inflamatórias como LTCD8⁺, NK⁺ e agentes citotóxicos essenciais como granzima B.

Na busca por drogas mais potentes e com menor IC50, e apesar da concentração mais alta de 100 μ M, o miglustato não possui efeito citotóxico em células normais de PBMC e esplenócitos de BALB/c (Tabela 2 e Tabela 3), fato importante no que se refere a novas abordagens para tratamento de doenças.

O miglustato foi testado em algumas linhagens neoplásicas não mostrando efeito citotóxico nas mesmas, podendo-se sugerir que o bloqueio da síntese de glicolipídios não seja tão crucial para a sobrevivência da célula neoplásica, podendo ocorrer em outros eventos celulares como por exemplo a migração. GUERRERA et al., (2003) mostram em seu estudo que o miglustato causa um retardo no desenvolvimento tumoral na linhagem de MM, fato esse que não conseguimos mostrar em nosso estudo.

O miglustato não se mostrou tóxico contra as células tumorais, mas como era esperado, ele teve efeito positivo no ensaio de migração, onde o composto conseguiu inibir as células de NG-97 migrassem no ensaio. O efeito era esperado pois as células tumorais utilizam dos glicolipídios de membrana para estabelecimento do microambiente tumoral, adesão, e para migração com conseqüente metástase (RAMBARUTH et al., 2011). Nossos resultados com migração mostram uma capacidade interessante e promissora do miglustato para este fim, cabendo mais estudos serem realizados para este tipo de reposicionamento.

Nossos resultados mostram efeito imunomodulador do miglustato frente as citocinas IFN- γ , e IL-17A. O efeito do miglustato sobre a expressão de citocinas já foi relatado previamente por DECHECCHI, et al., (2008), onde eles afirmaram que o miglustato tem efeito imunomodulador em fibrose cística de células brônquicas por causa de *P. aeruginosa*, onde há redução dos níveis de mRNA da quimiocina IL-8.

O IFN- γ mostra-se ser uma citocina central no controle da inflamação. Participa de eventos importantes da resposta imunológica como na comunicação entre a imunidade inata e adquirida, defesa contra infecções virais e bacterianas, regulação do ciclo celular e apoptose, ativação e maturação de células importantes como NKs, CTLs, participa na liberação de

quimiocinas importantes para recrutamento de células efetoras para o local de inflamação, dentre outras funções (SCHRODER et al., 2004; SELIGER et al., 2008; HU et al., 2008). A inibição desta citocina pode ser interessante para o tratamento de muitas patologias como por exemplo a artrite reumatoide, psoríase, entre outras doenças inflamatórias (HIROTA et al., 2018; CHANDRAKUMAR et al., 2015).

Seguindo um caminho inverso, o IFN- γ pode ser uma ferramenta de uso pró-tumoral por conta do efeito paralelo a inflamação que ele exerce. Acredita-se que através de sua capacidade de estimular células Tregs, e CTLs e NKs com capacidade de reparação tecidual, e modulação da resposta inflamatória, o câncer pode-se utilizar desses artifícios para escapar do sistema imune e progredir (IRMLER et al., 2007; OSTRAND-ROSENBERG et al., 2009; ZAIDI et al., 2011).

A IL-17A ao mesmo tempo participa ativamente de doenças inflamatórias e doenças autoimunes, mostrando ser um bom alvo a ser explorado pela sua relevância nessas doenças. (QIAN et al., 2015). Esta citocina tem ganhado atenção no câncer por estar encontrada em altas concentrações, sendo relacionada diretamente com a inibição do processo de apoptose das células tumorais, bloqueando respostas antitumorais, e promovendo angiogênese através da liberação de fatores pró-angiogênicos, metástase e invasão (QIAN et al., 2015). O miglustato, por inibir significativamente esta citocina mostra-se uma boa estratégia a ser estudada para o combate a doenças de cunho inflamatório e autoimunes, onde esta citocina tem papel importante.

A redução significativa dos níveis de IFN- γ e de IL-17A se mostrou bastante interessante. Na imunomodulação as reduções destes níveis mostram uma promissora alternativa para tratamento de doenças de cunho inflamatório, principalmente pela necessidade de se descobrir alternativas para os anti-inflamatórios existentes, que se mostram tóxicos e com efeitos colaterais adversos quando usados a longo prazo (WITTMANN et al., 2015).

Os linfócitos são uma das principais células produtoras de granzima B, onde este tipo de grânulo 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 diretamente ligada a patogênese de doenças desse cunho (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.

Na imunofenotipagem foi mostrada o aumento das células TCD4⁺, com a diminuição das células TCD8⁺ induzidas pelo miglustato. O aumento de células TCD4⁺ induzido pelo miglustato, pode ser uma estratégia eficiente em alguns tipos de doenças como por exemplo a AIDS, onde nesta doença há um comprometimento deste tipo celular por conta infecção viral (BALDAUF et al., 2017).

Muito se sabe sobre os papéis fundamentais das células NK, que vão desde a resposta imune inata, até imunovigilância e defesa contra células neoplásicas (GOTTHARDT et al., 2017). Uma hipótese acerca deste tipo celular intriga os pesquisadores há mais de 20 anos, onde relacionam mulheres com altos níveis de células NK no sangue periférico à infertilidade, ou falha na gestação (AOKI et al., 1995; ROUSSEV et al., 1996). Estudo recente indica o uso de terapias imunossupressoras para as mulheres que possuem altos níveis de NK no sangue periférico (TEMPLER et al., 2016). Nossos resultados mostram que o miglustato tem a capacidade de diminuir significativamente os níveis das células NK, podendo, através de mais estudos para comprovar a eficácia, ser uma forma de reposicionamento para esse tipo de problema.

Através de todos os dados mostrados, o reposicionamento do miglustato mostra-se potencialmente promissor no tratamento de doenças inflamatórias, devido ao seu efeito modulador sobre IFN- γ e IL-17A, citocinas chave no processo inflamatório. Os mecanismos indutores do composto na diminuição da razão entre CD4/ CD8 devem ser melhor estudados para comprovar sua reprodutibilidade, assim como a capacidade de diminuir os níveis de células NK. O miglustato mostrou-se eficaz também em inibir a migração em células neoplásicas de glioma humano.

8 CONCLUSÕES

O miglustato não se mostrou tóxico frente células PMBC e esplenócitos de BALB/c, onde também não apresentou toxicidade nas linhagens neoplásicas testadas. Foi observado um efeito imunomodulador significativo nas citocinas IFN- γ e IL-17A, e não significativo na citocina IL-6, mostrando um possível efeito imunomodulador do composto. O miglustato mostrou atividade antimigratória na linhagem neoplásica NG-97.

Foi observado uma mudança na razão entre as células CD4/CD8, induzida pelo miglustato. O composto foi capaz também de reduzir os níveis de células NK, e reduzir o nível de granzima B produzidas por células TCD4 e TCD8.

Através dos resultados obtidos, podemos concluir o efeito imunomodulador e antimigratório do miglustato, mostrando ser uma ferramenta promissora na reposição de fármacos.

REFERÊNCIAS

- ABE, A; WILD, S. R; LEE, W. L; SHAYMAN, J. A. Agents for the treatment of glycosphingolipid storage disorders. **J. Curr Drug Metab.** v.2, p.331–338, 2001.
- AGNELLO, D; LANKFORD, C. S; BREM, J; MORINOBU, A; GADINA, M; O'SHEA, J. J. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. **J Clin Immunol**, v.23, p.147–161, 2003.
- AOKI, K; KAJIURA, S; MATSUMOTO, Y; OGASAWARA, M; OKADA, S; YAGAMI, Y; & GLEICHER, N. Preconceptional and implantation failures. **Fertility & Sterility**, v.89, p.157–165, 1995.
- AURELI, M; SCHIUMARINI, D; LOBERTO, N; BASSI, R; TAMANINI, A; MANCINI, G; TIRONI, M; MUNARI, S; CABRINI, G; DECHECCHI, M. C; SONNINO, S. Unravelling the role of sphingolipids in cystic fibrosis lung disease. **Chem Phys Lipids**, v.200, p.94-103, 2016.
- BALDAUF, H. M; STEGMANN, L; SCHWARZ, S. M; AMBIEL, I; TROTARD, M; MARTIN, M; BURGGRAF, M; LENZI, G. M; LEJK, H; PAN, X; FREGOSO, O. I; LIM, E. S; ABRAHAM, L; NGUYEN, L. A; RUTSCH, F; KÖNIG, R; KIM, B; EMERMAN, M; FACKLER, O. T; KEPPLER O. T. Vpx overcomes a SAMHD1-independent block to HIV reverse transcription that is specific to resting CD4 T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.114, p.2729-2734, 2017.
- BETTELLI, E; CARRIER, Y; GAO, W; KORN, T; STROM, T. B; OUKKA, M; WEINER, H. L; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v.441, p.235–238, 2006.
- BIEBERICH, E; FREISCHÜTZ, B; SUZUKI, M; YU, R. K. Differential effects of glycolipid biosynthesis inhibitors on ceramide-induced cell death in neuroblastoma cells. **J Neurochem**, v.72, p.1040-1049, 1999.
- BIRKLÉ, S; ZENG, G; GAO, L; YU, R. K; AUBRY, J. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. **Biochimie**, v.85, p.455-463, 2003.
- BLASCHKE, S; VIERECK, V; SCHWARZ, G. Antiinflammatory effects of atorvastatin on peripheral blood mononuclear cells and synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol**, v.38, p.235–239, 2009.
- BRIAN, M. B; SRIRAM, S. S; DIANA, M. T; MARK, M. K; SAMY, A. F. M; MYLES, C. C. Gaucher's Disease and Cancer: A Sphingolipid Perspective. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v.18, p.221-234, 2013.
- BRODY, J. R; COSTANTINO, C, L; BERGER, A, C; SATO, T; LISANTI, M, P; YEO, C. J. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. **Cell Cycle**, v.8, p.1930–1934, 2009.
- BUTTERS, T. D; DWEK, R. A; PLATT, F. M. Imino sugar inhibitors for treating the lysosomal glycosphingolipidoses. **Glycobiology**, v.15, p.43–52, 2005.

CARUBIA, J. M; YU, R. K; MACALA, L. J; KIRKWOOD, J. M; VARGA, J. M. Gangliosides of normal and neoplastic human melanocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v.120, p.500-504, 1984.

CHALUBINSKI, M; M. BRONCEL. Influence of statins oneffector and regulatory immune mechanisms and their potential clinical relevance in treating autoimmune disorders. **Med. Sci. Monit**, v.16, p.245–251, 2010.

CHAN, J. F; CHIK, K. K; YUAN, S; YIP, C. C; ZHU, Z; TEE, K. M; TSANG, J. O; CHAN, C. C; POON, V. K; LU, G; ZHANG, A. J; LAI, K. K; CHAN K.H., KAO R.Y., YUEN K.Y. Novel antiviral activity and mechanism of bromocriptine as a Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitor. **Antiviral Res**, v.141, p.29-37, 2017.

CHANG, F; LI, R; LADISCH, S. Shedding of gangliosides by human medulloblastoma cells. **Exp Cell Res**, v.234, p.341-346, 1997.

CHATTERJEE, S; ALSAEEDI, N; HOU, J; BANDARU, V. V; WU, L; HALUSHKA, M. K; PILI, R; NDIKUYEZE, G; HAUGHEY, N. J. Use of a glycolipid inhibitor to ameliorate renal cancer in a mouse model. **PLoS One**, v.8, 2013.

CHEN, J. J; CAI, N; CHEN, G. Z; JIA, C. C; QIU, D. B; DU, C; LIU, W; YANG, Y; LONG, Z. J; ZHANG, Q. The neuroleptic drug pimozide inhibits stem-like cell maintenance and tumorigenicity in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**. v.8, p. 17593-17609, 2015.

CHONG, C. R; SULLIVAN, D. J. New uses for old drugs. **Nature**, v.448, p.645-646, 2007. CROFT, S. L; SEIFERT, K; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J Med Res**, v.123, p.399-410, 2006.

DECHECCHI, M. C; NICOLIS, E; NOREZ, C; BEZZERRI, V; BORGATTI, M; MANCINI I; RIZZOTTI, P; RIBEIRO, C. M; GAMBARI, R; BECQ, F; CABRINI, G. Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells. **J Cyst Fibros**, v.7, p.555-565, 2008.

DIJKHUIS, A. J; KLAPPE, K; KAMPS, W; SIETSMA, H; KOK, J. W. Gangliosides do not affect ABC transporter function in human neuroblastoma cells. **J Lipid Res**, v.47, p.1187-1195, 2006.

DOLO, V; D'ASCENZO, S; SORICE, M; PAVAN, A; SCIANNAMBLO, M; PRINETTI, A; CHIGORNO, V; TETTAMANTI, G; SONNINO, S. New approaches to the study of sphingolipid enriched membrane domains: the use of electron microscopic autoradiography to reveal metabolically tritium labeled sphingolipids in cell cultures. **Glycoconj J**, v.17, p.261-268, 2000.

DRAGANOV, D; GOPALAKRISHNA-PILLAI, S; CHEN, Y. R; ZUCKERMAN, N; MOELLER, S; WANG, C; ANN, D; LEE, P. P. Modulation of P2X4/P2X7/Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. **Sci Rep**, v.5, p.16222, 2015.

EDWARDS, C. M; EDWARDS, J. R; LWIN, S. T; ESPARZA, J; OYAJOB, B. O; MCCLUSKEY, B; MUNOZ, S; GRUBBS, B; MUNDY, G. R. Increasing Wnt signaling in the bone marrow microenvironment inhibits the development of myeloma bone disease and reduces tumor burden in bone in vivo. **Blood**, v.111, p.2833-2842, 2008.

- ERSEK, A; XU, K; ANTONOPOULOS, A; BUTTERS, T. D; SANTO, A. E; VATTAKUZHI, Y; WILLIAMS, L. M; GOUDEVENOU, K; DANKS, L; FREIDIN, A; SPANOUDAKIS, E; PARRY, S; PAPAIOANNOU, M; HATJIHARISSI, E; CHAIDOS, A; ALONZI, D. S; TWIGG, G; HU, M; DWEK, R. A; HASLAM, S. M; ROBERTS, I; DELL, A; RAHEMTULLA, A; HORWOOD, N. J; KARADIMITRIS, A. Glycosphingolipid synthesis inhibition limits osteoclast activation and myeloma bone disease. **J Clin Invest**, v.125, p.2279-2792.
- FEMKE, B; SERGEI, G. **A2 T cell subsets and T cell-mediated immunity**. Principles of Immunopharmacology *3rd edition*. 15-27.
- FISCHER, G; HÜBNER, S. O., VARGAS, G. D., VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. **Arq. Inst. Biol**, v.75, p.247-253, 2008.
- FISCHER, P. B; COLLIN, M; KARLSSON, G. B; JAMES, W; BUTTERS, T. D; DAVIS, S. J; GORDON, S; DWEK, R. A; PLATT, F. M. The alpha-glucosidase inhibitor N-butyldeoxynojirimycin inhibits human immunodeficiency virus entry at the level of post-CD4 binding. **J Virol**, v.69, p.5791-5797, 1995.
- FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Química nova**, 2014.
- FURUKAWA, K; ARITA, Y; SATOMI, N; EISINGER, M; LLOYD, K. O. Tumor necrosis factor enhances GD3 ganglioside expression in cultured human melanocytes. **Arch Biochem Biophys**, v.281, p.70-75, 1990.
- GOLDBACH-MANSKY, R; SUSON, S; WESLEY, R; HACK, C. E; EL-GABALAWY, H. S; TAK, P. P. Raised granzyme B levels are associated with erosions in patients with early rheumatoid factor positive rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v.64, p.715-721, 2005.
- GOLDMAN, J. E, HIRANO, M; YU, R. K, SEYFRIED, T. N. GD3 ganglioside is a glycolipid characteristic of immature neuroectodermal cells. **J Neuroimmunol**, v.7, p.179-192, 1984.
- GOTTHARDT, D, SEXL, V. STATs in NK-Cells: The Good, the Bad, and the Ugly. **Front Immunol**, v.7, p.694, 2017.
- GUERRERA, M; LADISCH, S. N-butyldeoxynojirimycin inhibits murine melanoma cell ganglioside metabolism and delays tumor onset. **Cancer Lett**, v.201, p.31-40, 2003.
- HAKOMORI, S. Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. **Curr Opin Hematol**, v.10, p.16-24, 2003.
- HELENIUS, A; AEBI, M. Intracellular functions of N-linked glycans. **Science**, v.291, p.2364-2369, 2001.
- HIROTA, K; HASHIMOTO, M; ITO, Y; MATSUURA, M; ITO, H; TANAKA, M; WATANABE, H; KONDOH, G; TANAKA, A; YASUDA, K; KOPF, M; POTOCHNIK, A. J; STOCKINGER, B; SAKAGUCHI, N; SAKAGUCHI, S. Autoimmune Th17 Cells Induced Synovial Stromal and Innate Lymphoid Cell Secretion of the Cytokine GM-CSF to Initiate and Augment Autoimmune Arthritis. **Immunity**, v.18, p.30146-30148, 2018.
- HORWOOD, N. J; ELLIOTT, J; MARTIN, T. J; GILLESPIE, M. T. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. **Endocrinology**, v.139, p.4743-4746, 1998.

- HU, X; CHAKRAVARTY, S. D; IVASHKIV, L. B. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. **Immunol Rev**, v.226, p.41–56, 2008.
- HUANG, C. H; CHANG, P. M; HSU, C. W; HUANG, C. Y; NG, K. L. Drug repositioning for non-small cell lung cancer by using machine learning algorithms and topological graph theory. **BMC Bioinformatics**, 2016.
- HUANG, W; LU, C; WU, Y; OUYANG, S; CHEN, Y. T-type calcium channel antagonists, mibefradil and NNC-55-0396 inhibit cell proliferation and induce cell apoptosis in leukemia cell lines. **J Exp Clin Cancer Res**, p.34-54, 2015.
- HURST, S. M; WILKINSON, T. S; MCLOUGHLIN, R. M; JONES, S; HORIUCHI, S; YAMAMOTO, N; ROSE-JOHN, S; FULLER, G. M; TOPLEY, N; JONES, S. A. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment. **Immunity**, v.14, p.705–714, 2001.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas 2012-2013**: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009, p. 98.
- INOKUCHI, J; MASON, I; RADIN, N.S. Antitumor activity via inhibition of glycosphingolipid biosynthesis. **Cancer Lett**, v.38, p.23-30, 1987.
- IRMLER, I.M; GAJDA, M; BRAUER, R. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. **J Immunol**, v.179, p.6228–6236, 2007.
- IWABUCHI, K; NAKAYAMA, H; IWAHARA, C; TAKAMORI, K. Significance of glycosphingolipid fatty acid chain length on membrane microdomain-mediated signal transduction. **FEBS Lett**, v.584, p.1642-1652, 2010.
- IWABUCHI, K; NAKAYAMA, H; OIZUMI, A; SUGA, Y; OGAWA, H; TAKAMORI, K. Role of Ceramide from Glycosphingolipids and Its Metabolites in Immunological and Inflammatory Responses in Humans. **Mediators Inflamm**, 2015.
- IWAMOTO, T; FUKUMOTO, S; KANAOKA, K; SAKAI, E; SHIBATA, M; FUKUMOTO, E; INOKUCHI, J.I.J; TAKAMIYA, K; FURUKAWA, K; FURUKAWA, K; KATO, Y; MIZUNO, A. Lactosylceramide is essential for the osteoclastogenesis mediated by macrophage-colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. **J Biol Chem**, v.276, p.46031-46038, 2001.
- JONES S. A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. **J. Immunol**, v.175, p.3463–3468, 2005.
- KAPLANSKI, G; MARIN, V; MONTERO-JULIAN, F; MANTOVANI, A; FARNARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunol**, v.24, p.25–29, 2003.
- KARLSSON, G.B; BUTTERS, T.D; DWEK, R.A; PLATT, F.M. Effects of the imino sugar N-butyldeoxynojirimycin on the N-glycosylation of recombinant gp120. **J Biol Chem**, v.268, p.570-576, 1993.
- KARLSSON, K. A. On the chemistry and occurrence of sphingolipid long-chain bases. *Chem Phys Lipids*, v.5, p.6-43, 1970.

- KATZ, J. B; MULLER, A. J; PRENDERGAST, G.C. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. **Immunol Rev**, v.222, p.206–221, 2008.
- KIN P; GUPTA, K. Drug repositioning: re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. **J Postgrad Med**, v.57, p.153-160, 2011.
- KOLTER, T; PROIA, R. L; SANDHOFF, K. Combinatorial ganglioside biosynthesis. **J Biol Chem**, v.277, p.25859-25862, 2002.
- KONG, Y; LI, R; LADISCH, S. Natural forms of shed tumor gangliosides. **Biochim Biophys Acta**, v.1394, p.43-56, 1998.
- LEYSSSENS, C; VERLINDEN, L; VERSTUYF, A. Antineoplastic effects of 1,25(OH)₂D₃ and its analogs in breast, prostate and colorectal cancer. **Endocr Relat Cancer**, v.22, p.31-47, 2013.
- LI, R. X; LADISCH, S. Shedding of human neuroblastoma gangliosides. **Biochim Biophys Acta**, v.1083, p.57-64, 1991.
- LOHMAN, R. J; IYER, A; FAIRLIE, T. J; COTTERELL, A; GUPTA, P; REID, R. C; VESEY, D. A; SWEET, M. J; FAIRLIE, D. P. Differential Anti-inflammatory Activity of HDAC Inhibitors in Human Macrophages and Rat Arthritis. **J Pharmacol Exp Ther**, v.356, p.387-396, 2016.
- MANGAN, P. R; HARRINGTON, L. E; O'QUINN, D. B; HELMS, W. S; BULLARD, D. C; ELSON, C. O; HATTON, R. D; WAHL, S. M; SCHOEB, T. R; WEAVER, C.T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. **Nature**, v.441, p.231–234, 2006.
- MANOURY-SCHWARTZ, B; CHIOCCHIA, G; BESSIS, N; ABEHSIRA-AMAR, O; BATTEUX, F; MULLER, S. Highsusceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. **J Immunol**, v.158, p.5501–5506, 1997.
- MELO, E; CARVALHO, I. a e b-glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. **Quím. Nova**, p.29, v840-843, 2006.
- MÜLLBERG, J; GEIB, T; JOSTOCK, T; HOISCHEN, S.H; VOLLMER, P; VOLTZ, N; HEINZ, D; GALLE, P.R; KLOUCHE, M; ROSE-JOHN, S. IL-6-receptor independent stimulation of human gp130 by viral IL-6. **J. Immunol**, v.164, p.4672–4677, 2000.
- NOJIRI, H; TAKAKU, F; TERUI, Y; MIURA, Y; SAITO, M. Ganglioside GM3: an acidic membrane component that increases during macrophage-like cell differentiation can induce monocytic differentiation of human myeloid and monocytoid leukemic cell lines HL-60 and U937. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.83, p.782-786, 1986.
- OSTRAND-ROSENBERG, S; SINHA, P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. **J Immunol**, v.182, p.4499–44506, 2009.
- PARK, J. Y; CHOI, H; HWANG, J. S; KIM, J; CHANG, I. S. Enhanced depigmenting effects of N-glycosylation inhibitors delivered by pH-sensitive liposomes into HM3KO melanoma cells. **J Cosmet Sci**, v.59, p.139-150, 2008.
- PEREIRA, M. C; CARDOSO, P. R; DA ROCHA, L. F; RÊGO, M. J; GONÇALVES, S. M; SANTOS, F. A; GALDINO-PITTA, M. R; DANTAS, A. T; DUARTE, Â. L; PITTA, M. G.

Simvastatin inhibits cytokines in a dose response in patients with rheumatoid arthritis. **Inflamm Res**, v.63, p.309-315, 2014.

PESTKA, S; KRAUSE, C. D; WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunol Rev**, v.202, p.8–32, 2004.

PLATT, F. M; NEISES, G. R; KARLSSON, G. B; DWEK, R. A; BUTTERS, T. D. N-butyldeoxygalactonojirimycin inhibits glycolipid biosynthesis but does not affect N-linked oligosaccharide processing. **J Biol Chem**, v.269, p.27108-27114, 1994.

PRENDERGAST, G. C. Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO. **Oncogene**, v.27, p.3889–3900, 2008.

PUKEL, C. S; LLOYD, K. O; TRAVASSOS, L. R; DIPPOLD, W. G; OETTGEN, H. F; OLD, L. J. GD3, a prominent ganglioside of human melanoma. Detection and characterisation by mouse monoclonal antibody. **J Exp Med**, v.155, p.1133-1147, 1982.

QIAN, X, CHEN, H; WU, X; HU, L; HUANG, Q; JIN, Y. Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis. **Cytokine**, v.89, p.34-44, 2017.

RAMBARUTH, N. D. S; DWEK, M. V. Cell surface glycan-lectin interactions in tumor metastasis. **Acta Histochemica**, v.6, p.591–600, 2011.

RANES, M. K; EL-ABBADI, M; MANFREDI, M. G; MUKHERJEE, P; PLATT, F. M; SEYFRIED, T. N. N-butyldeoxynojirimycin reduces growth and ganglioside content of experimental mouse brain tumours. **Br J Cancer**, v.84, p.1107-1114, 2001.

RAVINDRANATH, M. H; TSUCHIDA, T; MORTON, D. L; IRIE, R. F. Ganglioside GM3:GD3 ratio as an index for the management of melanoma. **Cancer**, v.67, p.3029-3035, 1991.

ROMANO, M; SIRONI, M; TONIATTI, C; POLENTARUTTI, N; FRUSCELLA, P; GHEZZI, P; FAGGIONI, R; LUINI, W; VAN HINSBERGH, V; SOZZANI, S; BUSSOLINO, F; POLI, V; CILIBERTO, G; MANTOVANI, A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment, **Immunity**, v.6, p.315–325, 1997.

ROTHWELL, P. M; WILSON, M; PRICE, J. F; BELCH, J. F; MEADE, T. W; MEHTA, Z. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. **Lancet**, v.379, p.1591-1601, 2012.

ROUSSEV, R. G; KAIDER, B. D; PRICE, D. E; & COULAM, C. B. Laboratory evaluation of women experiencing reproductive failure. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.35, p.415–420, 1996.

RUSNATI, M; TANGHETTI, E; URBINATI, C; TULIPANO, G; MARCHESINI, S; ZICHE, M; PRESTA, M. Interaction of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) with free gangliosides: biochemical characterization and biological consequences in endothelial cell cultures. **Mol Biol Cell**, v.10, p.313-327, 1999.

RUSSELL, R. G. Bisphosphonates: the first 40 years. **Bone**, v.49, 2011

SALLUSTO, F; LANZAVECCHIA, A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. **Eur J Immunol**, v.39, p.2076–2082, 2009.

- SAPONARA, M; PANTALEO, M. A; NANNINI, M; BIASCO, G. Treatments for gastrointestinal stromal tumors that are resistant to standard therapies. **Future Oncol**, v.10, p.2045-2059, 2014.
- SCHÄCKE, H; DÖCKE, W. D; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v.96, p.23–43, 2002.
- SCHELLER, J; CHALARIS, A; SCHMIDT-ARRAS, D; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys**, v.1813, p.878-888, 2011.
- SCHRODER, K; HERTZOG, P. J; RAVASI, T; HUME, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J Leukoc Biol**, v.75, p.163–189, 2004.
- SELIGER, B; RUIZ-CABELLO, F; GARRIDO, F. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. **Adv Cancer Res**, v.101, p.249–276, 2008.
- SHRIVER, Z; RAGURAM, S; SASISEKHARAN, R. Glycomics: a pathway to a class of new and improved therapeutics. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v.3, p.863, 2004.
- SILVA-SANTOS, B; SERRE, K; NORELL, H; $\gamma\delta$ T cells in cancer. **Nat Rev Immunol**, v.15, p.683-691, 2015.
- SLEIGH, S. H; BARTON, C. L. Repurposing strategies for therapeutics. **Pharm Med**, v.24, p.151-159, 2010.
- SNIDER, A. J; GANDY, K. A; OBEID, L. M. Sphingosine kinase: Role in regulation of bioactive sphingolipid mediators in inflammation. **Biochimie**, v.92, p.707-15, 2010.
- SONNINO, S; PRINETTI, A; MAURI, L; CHIGORNO, V; TETTAMANTI, G. Dynamic and structural properties of sphingolipids as driving forces for the formation of membrane domains. **Chem Rev**, v.106, p.2111-2125, 2006.
- STACHNIK, A; YUEN, T; IQBAL, J; SGOBBA, M; GUPTA, Y; LU, P; COLAIANNI, G; JI, Y; ZHU, L. L; KIM, S. M; LI, J; LIU, P; IZADMEHR, S; SANGODKAR, J; SCHERER, T; MUJTABA, S; GALSKY, M; GOMEZ, J; EPSTEIN, S; BUETTNER, C; BIAN, Z; ZALLONE, A; AGGARWAL, A. K; HAIDER, S; NEW, M. I; SUN, L; NARLA, G; ZAIDI, M. Repurposing of bisphosphonates for the prevention and therapy of nonsmall cell lung and breast cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.111, p.7995-8000, 2014.
- STOLARZ, A. J; FARRIS, R. A; WILEY, C. A; O'BRIEN, C. E; PRICE, E. T. Fenofibrate Attenuates Neutrophilic Inflammation in Airway Epithelia: Potential Drug Repurposing for Cystic Fibrosis. **Clin Transl Sci**, v.8, p.696-701, 2015.
- SUNDAR, S; JHA, T. K; THAKUR, C. P; ENGEL, J; SINDERMANN, H; FISCHER, C; JUNGE, K; BRYCESON, A. BERMAN, J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med**, v.28, p.1739-1746, 2002.
- TAK, P. P; SPAENY-DEKKING, L; KRAAN, M. C; BREEDVELD, F. C; FROELICH, C. J; HACK, C. E; The levels of soluble granzyme A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). **Clin Exp Immunol**, v.116, p.366-372, 1999.
- TANG, T. T; SONG, Y; DING, Y. J. Atorvastatin upregulates regulatory T cells and reduces clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **J. Lipid Res**, v.52, p.1023–1032, 2011.

TEMPLER, S; SACKS, G. A blessing and a curse: is high NK cell activity good for health and bad for reproduction? **Hum Fertil (Camb)**, v.3, p.166-172, 2016.

TIRELLI, K. M. Estudos das características bioquímicas da β -Glicosidase humana em indivíduos homozigotos e heterozigotos para a doença de Gaucher com mutações pré-determinadas: comparação com indivíduos normais. **2005**.

TORRES, T; FILIPE, P. Interleukin-17 as a Therapeutic Target in Psoriasis. **Acta Med Port**, v.27, p.252-258, 2014.

TREMOULET, A. H. The role of statins in inflammatory vasculitides, **Autoimmunity**, v.48, p.177-180, 2015.

TRISCOTT, J; LEE, C; HU, K; FOTOVATI, A; BERNS, R; PAMBID, M; LUK, M; KAST, R. E; KONG, E; TOYOTA, E; YIP, S; TOYOTA, B; DUNN, S. E. Disulfiram, a drug widely used to control alcoholism, suppresses the self-renewal of glioblastoma and over-rides resistance to temozolomide. **Oncotarget**, v.3, p.1112-1123, 2012.

VARKI A. et al., **Glycosylation Changes in Cancer**. Essentials of Glycobiology, 2nd edition, Chapter 44.

VIEGAS, Jr; BOLZANI, V. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Qim. Nova**, v.29, p.326-337, 2006.

VOLLENWEIDER, F; BENJANNET, S; DECROLY, E; SAVARIA, D; LAZURE, C; THOMAS, G; CHRÉTIEN, M; SEIDAH, N. G. Comparative cellular processing of the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoprotein gp160 by the mammalian subtilisin/kexin-like convertases. **Biochem J**, v.314, p.521-532, 1996.

WANG, J; YU, R. K; Interaction of ganglioside GD3 with an EGF receptor sustains the self-renewal ability of mouse neural stem cells in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.110, p.19137-19142, 2013.

WILSON, C; HOLEN, I; COLEMAN, R. E. Seed, soil and secreted hormones: Potential interactions of breast cancer cells with their endocrine/paracrine microenvironment and implications for treatment with bisphosphonates. **Cancer Treat Rev**, v.38, p.877-889, 2012.

WITTMANN, C; REISCHL, M; SHAH, A. H; KRONFUSS, E; MIKUT, R; LIEBEL, U; GRABHER, C. A Zebrafish Drug-Repurposing Screen Reveals sGC-Dependent and sGC-Independent Pro-Inflammatory Activities of Nitric Oxide. **PLoS One**, v.10, 2015.

YASMEEN, A; BEAUCHAMP, M. C; PIURA, E; SEGAL, E; POLLAK, M; GOTLIEB, W. H. Induction of apoptosis by metformin in epithelial ovarian cancer: involvement of the Bcl-2 family proteins. **Gynecol Oncol**, v.121, p.492-498, 2011.

YEH, S. C; WANG, P. Y; LOU, Y. W; KHOO, K. H; HSIAO, M; HSU, T. L; WONG, C. H. Glycolipid GD3 and GD3 synthase are key drivers for glioblastoma stem cells and tumorigenicity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.113, p.5592-5597, 2016.

ZAIDI, M. R, MERLINO, G. The two faces of interferon- γ in cancer. **Clin Cancer Res**, v.17, p.6118-6124, 2011.

ANEXO A – ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO. QUALIS FARMÁCIA (A1)

Cellular Physiology
and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2017;41:xx-xx

DOI:

Published online: xxxxx, 2017

Accepted: January 17, 2017 /13.10.16

© 2017 The Author(s)
Published by S. Karger AG, Basel
www.karger.com/cpb

Karger
Open access

1

This article is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (CC BY-NC-ND) (<http://www.karger.com/Services/OpenAccessLicense>). Usage and distribution for commercial purposes as well as any distribution of modified material requires written permission.

Review

Glycobiology Modifications in Intratumoral Hypoxia: The Breathless Side of Glycans Interaction

Antônio F. Silva-filho^a Wanessa L.B. Sena^a Luiza R.A. Lima^{a,b} Lidiane V.N. Carvalho^a
Michelly C. Pereira^{a,c} Lucas G.S. Santos^a Renata V.C. Santos^a Lucas B. Tavares^a
Maira G.R. Pitta^{a,d} Moacyr J.B.M. Rêgo^{a,d}

^aLaboratory of Immunomodulation and New Therapeutic Approaches (LINAT), Center for Research on Therapeutic Innovation - Suely Galdino (NUPIT-SG-UFPE), Recife, ^bFaculdades Integradas de Patos, Patos, PB, ^cDepartment of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, ^dDepartment of Biochemistry, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil

**ANEXO B – TRABALHO COMPLETO APRESENTADO NO ENCONTRO
BRASILEIRO PARA INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO MIGLUSTATO *Zavesca*®
SOBRE INTERFERON-GAMA E INTERLEUCINA-6: UM POSSÍVEL MECANISMO
PARA UM FUTURO REPOSICIONAMENTO?**

L. G. S. SANTOS¹, M. F. CORDEIRO¹, F. G. BESERRA¹, L. C. TORRES², M. G. R. PITTA¹, M. J. B. M. RÊGO¹

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

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

E-mail: Lucasbiomedico@live.com