

PRODUTOS NATURAIS E SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS COMO FONTES INOVADORAS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

Elaine Maria de Souza Fagundes¹, Vanessa Peruhype-Magalhaes², Márcio Sobreira Silva Araújo², Patrícia Parreiras³, Betânia Barros Cota², Ezequias Pessoa de Siqueira², Andrea Teixeira de Carvalho², Olindo de Assis Martins-Filho²

Introdução

A iniciativa da Fapemig com a criação do edital PPSUS representou um avanço importante na consolidação de iniciativas de programas estruturantes interinstitucionais. Nesse contexto, ações de parceria entre ECTIs do Estado de Minas Gerais, incluindo atividades multidisciplinares estabelecidas entre CPqRR/UFMG/UFOP permitiram a criação de dois programas estruturantes com impacto promissor, a longo prazo, para a disponibilização de insumos para a saúde pública. Entre eles, podemos citar o RIPAg (Rede Integrada de Pesquisa de Antígenos Recombinantes aplicados no diagnóstico de doenças negligenciadas) e o P3D (Programa de Descoberta e Desenvolvimento de Drogas para tratamento de doenças negligenciadas). A criação do P3D representou um marco na iniciativa de elaboração de projetos de pesquisas que foram submetidos ao Edital de Grupos Emergentes em 2009 e ao PPSUS em 2010. O P3D possui uma estrutura de delineamento experimental que inclui diversos eixos do processo de Descoberta e Desenvolvimento de Drogas. Entre eles, ensaios de triagem inicial de produtos naturais e substâncias sintéticas, empregando ensaios *in vitro* (ensaio de atividade biológica) e *in vivo* (toxicidade aguda em modelo animal)

foram subsidiados pelos programas apoiados pela Fapemig. No âmbito do P3D, as leishmanioses foram eleitas como doenças negligenciadas importantes como alvo na busca de novas alternativas de tratamento. As opções terapêuticas para o tratamento das leishmanioses são insuficientes e apresentam problemas como baixa eficácia, elevada toxicidade e a emergência de cepas resistentes. Esse cenário é agravado pelo número limitado e pela falta de inovação nos programas de desenvolvimento de novos fármacos na área de doenças negligenciadas. Neste contexto, no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, os ensaios biológicos são imprescindíveis para a identificação de compostos bioativos. Os ensaios utilizados para a triagem de drogas com atividade citotóxica para protozoários do gênero *Leishmania* compreendem diferentes processos, incluindo a utilização do parasito íntegro (forma livre ou intracelular) ou enzimas específicas de seu metabolismo como alvo celular. Esses ensaios permitem a triagem de um grande número de amostras que, apresentando atividade, são posteriormente submetidas a ensaios secundários confirmatórios para descrição da atividade observada e sua toxicidade, por meio de metodologias de maior complexidade. Sendo

¹ Universidade Federal de Minas Gerais

² Centro de Pesquisas René Rachou

³ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

assim, um dos focos do presente projeto consistiu na padronização de um novo ensaio funcional multiparamétrico que permite simultaneamente a avaliação de compostos com potencial leishmanicida e sua citotoxicidade (imunotoxicidade).

Objetivo

Padronizar uma nova metodologia multiparamétrica *in vitro* por citometria de fluxo para avaliar potenciais atividades leishmanicida e citotóxica de substâncias puras e produtos naturais, com vistas à descoberta de protótipos úteis para o desenvolvimento de outros fármacos antiparasitários, com ênfase em doenças negligenciadas como as leishmanioses.

Metodologia

O método desenvolvido consiste em um ensaio de internalização de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* fluorescentes por monócitos do sangue periférico humano (processo de fagocitose) e análise simultânea de toxicidade por citometria de fluxo. Foram estabelecidas as condições ideais para avaliar a eficiência de fagocitose pela determinação do percentual de internalização de formas promastigotas fluorescentes e de avaliação de citotoxicidade por quantificação de células em apoptose e necrose. Onze extratos vegetais e quatro substâncias sintéticas sabidamente leishmanicidas, por avaliação em ensaios convencionais, apresentaram diferentes perfis de resposta leishmanicida e de citotoxicidade. Dois fármacos de uso clínico (Anfotericina B e Glucantime®) foram utilizados como referência nessa nova metodologia.

Resultados

Numa etapa inicial, tivemos sucesso na identificação de um produto natural isolado de basidiomicetos que apresentou atividade antiparasitária *in vitro* contra formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* e

Leishmania, sem alteração dos fenótipos de células CD16(+), CD14(+), CD19(+), CD4(+) e CD8(+) do sangue periférico humano, demonstrando efeito imunomodulador não citotóxico. Em estudo paralelo, foi estabelecido um ensaio de identificação de substâncias com potencial leishmanicida e baixa imunotoxicidade, permitindo, assim, identificar novas entidades químicas úteis para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas utilizando a citometria de fluxo.

Conclusão

A iniciativa de criação do PPSUS pela Fapemig estimulou o fortalecimento de projetos de pesquisa inicialmente conduzidos de forma isolada por ECTIs do Estado de Minas Gerais, permitindo a formação de Consórcios de Pesquisadores direcionados em busca de soluções para o diagnóstico e o tratamento de doenças negligenciadas. A continuidade de investimentos na modalidade PPSUS – Doenças Negligenciadas certamente permitirá que outras iniciativas de criação de consórcios multidisciplinares interinstitucionais possam ser estabelecidos, além de subsidiar a continuidade das parcerias já existentes no Estado de Minas Gerais. Em suma, o novo ensaio funcional demonstrou ser útil como uma metodologia confirmatória para a seleção de substâncias ou extratos brutos mais promissores. A inovação metodológica alcançada com esse projeto demonstrou ser um ensaio multiparamétrico mais robusto, de maior sensibilidade e quantitativo. A substância / extrato bruto de melhor atividade antiparasitária avaliada pela redução de parasitos fagocitados pelos monócitos e menor toxicidade nesse ensaio poderá ser selecionada entre seus pares para os posteriores estudos nas diferentes etapas de desenvolvimento de fármacos, bem como para estudos *in vivo*. ■

Palavras-chave: Produtos Naturais, *L. (V.) braziliensis*, Fagocitose, Citotoxicidade, Citometria de Fluxo.