

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ANÁLOGO DE 2,8-BIS (TRIFLUOROMETIL) QUINOLINA SOBRE *Trichomonas vaginalis* E ANÁLISE CITOTÓXICA EM CÉLULAS VERO

NICOLE RAMOS SCHOLL¹; BÁRBARA DA ROCHA FONSECA²; LUIZA DOMINGUES MORON²; GABRIEL BRENNER²; MIRNA SAMARA DIÉ ALVES²; SIBELE BORSUK³

¹Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel - nicoleramosscholl@hotmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel - barbfonseca@hotmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel - moronluiza@gmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel Pelotas - gabrielbrenner123@gmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel - mirnadie@gmail.com

³Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – sibeleborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A tricomoníase é a infecção sexualmente transmissível (IST) não-viral mais recorrente no mundo, atingindo cerca de 276 milhões de pessoas por ano e demonstrando-se mais prevalente em mulheres (WHO, 2012). A doença é caracterizada por um amplo espectro clínico, causando desde casos assintomáticos a severa vaginite e cérvix morango em mulheres e uretrite e prostatite em homens. Além disso, a tricomoníase pode atuar como um cofator facilitador na contaminação pelo vírus do HIV e intensificar o risco de parto prematuro, doença inflamatória pélvica e câncer cervical e de próstata (MENEZES et al., 2016).

Essa IST é causada pelo parasito *Trichomonas vaginalis* (Tv), um protozoário flagelado, anaeróbico facultativo que infecta principalmente o epitélio escamoso do trato genital. Esse protozoário é desprovido de mitocôndria, possuindo invés disso, organelas específicas conhecidas como hidrogenossomos, os quais são responsáveis pelo fornecimento de energia à célula (MENEZES et al., 2016). Os tratamentos já estabelecidos para tricomoníase são baseados na classe de fármacos dos 5'-nitroimidazóis, mais especificamente o metronidazol (MTZ) e o tinidazol (TNZ) que são pró-fármacos ativados nos hidrogenossomos que levam a produção de radicais nitro citotóxicos que causam danos à célula ocasionando a morte do protozoário (LEITSCH, 2016).

Estes medicamentos apresentam restrições, como por exemplo reações alérgicas, reações adversas e infecções recorrentes (SEÑA et al., 2014) o que dificulta o tratamento em pacientes sensíveis à essa classe de fármacos. Há ainda relatos na literatura de isolados clínicos resistentes à esta classe química (KIRKCALDY et al., 2012), comprovando assim a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos com atividade anti-Tv que sejam mais eficazes e menos tóxicos.

Em um estudo realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, foram analisadas duas 2,8-bis (trifluorometil) quinolinas (QDA-1, QDA-2), visto que as mesmas foram descritas na literatura como moléculas com atividade antiviral (BARBOSA-LIMA et al., 2017), antimicrobiana (SUMANGALA et al., 2010) e antimalárica (HAMANN et al., 2014) e possuíam, portanto, um perfil farmacológico de interesse. Após as análises realizadas, foi demonstrado o potencial tricomicida do composto QDA-1. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi estabelecer a concentração inibitória mínima (MIC) deste composto sobre

Trichomonas vaginalis e avaliar a sua atividade citotóxica em células epiteliais de rim de macaco verde africano (VERO).

2. METODOLOGIA

Para realização do ensaio de MIC, foi utilizado o cultivo do isolado ATCC 30236 de *T. vaginalis*, suscetível ao MTZ, o qual foi mantido em meio tripticase-extrato de levedo-maltose (TYM), suplementado com 10% de soro bovino adulto, 3% de estreptomicina (5 mg/mL) e incubado a 37 °C em estufa de O₂.

Para o experimento foram utilizadas microplacas de cultivo de 96 cavidades, contendo 150 µL/cavidade do cultivo na densidade de $2,6 \times 10^5$ trofozoítos/mL, aos quais foram adicionados 50 µL/cavidade de meio TYM contendo o composto QDA-1 em diferentes concentrações (100 µM a 200 µM, em intervalos de 20 µM). Foram utilizados ainda três controles: positivo (MTZ a 100 µM), negativo (apenas trofozoítos) e DMSO 0,6%. Posteriormente, a placa foi incubada a 37° C em estufa de 5% de CO₂ por 24 h.

Após a incubação, a placa foi analisada e o volume das cavidades referentes ao MIC, às concentrações imediatamente acima e abaixo do MIC e aos controles foram transferidos para tubos eppendorfs contendo 1,5 mL de meio TYM, suplementados com 10% de SBS e 3% de estreptomicina (5 mg/mL). Os tubos foram reincubados em estufa de 5% de CO₂ por 96 h e os trofozoítos foram contados em câmaras de Neubauer a cada 24 h para confirmação do MIC.

O cultivo das células VERO foi realizado em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% L-glutamina e 1% penicilina/estreptomicina e mantido a 37 °C em estufa com 5% CO₂. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram cultivadas em microplacas de 96 cavidades na concentração de 2×10^4 células/cavidade (100 µL) e armazenadas por 24 h a 37 °C em estufa de 5% de CO₂. Após a incubação, foram adicionados 100 µL/cavidade de meio RPMI contendo o composto nas seguintes concentrações: 12,5, 25, 50, 100 e 200 µM. Foram também adicionados os controles negativo (meio RPMI 1640), DMSO 0,6% e MTZ a 100 µM, e a placa foi novamente incubada por 24 h.

Posteriormente, o meio RPMI foi removido e foram adicionados 100 µL/cavidade de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (5mg/ml) e as placas foram reincubadas por 3 h. Por fim, 100 µL de DMSO foram adicionados em cada cavidade e as placas foram analisadas em um leitor de microplacas a 492 nm. Após a análise, a inibição do crescimento foi determinada através de porcentagem, pela seguinte fórmula: $(1 - \text{Abs}_{492} \text{ células tratadas} / \text{Abs}_{492} \text{ células controle}) \times 100$. Os ensaios foram realizados de forma independente pelo menos três vezes em triplicata.

Para as análises estatísticas, utilizou-se a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey, com $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software GraphPad Prism versão 7.03.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A faixa de concentrações utilizada no ensaio permitiu a determinação do MIC de QDA-1 sobre *T. vaginalis* e observou-se ainda que o composto reduziu a viabilidade dos trofozoítos em 31,7%, 54,4%, 84,5%, 91,2%, 94,9% e 100% nas concentrações de 100 µM, 120 µM, 140 µM, 160 µM, 180 µM e 200 µM, respectivamente (Figura 1). A concentração de 160 µM foi determinada como o MIC, pois além de não demonstrar diferença estatística significativa do fármaco convencional (MTZ), foi a menor concentração que inibiu completamente o

crescimento dos trofozoítos em 24 h, de forma que os protozoários não recuperaram a viabilidade no teste de confirmação.

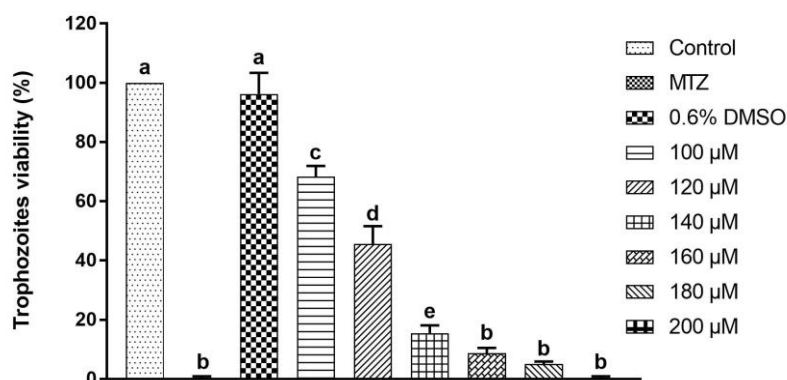


Figura 1. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de QDA-1 sobre *Trichomonas vaginalis* ATCC 30236 após 24 h de exposição a diferentes concentrações. Control (trofozoítos não-tratados), 0.6% DMSO (veículo para solubilização), MTZ (metronidazol a 100 µM). Letras diferentes indicam diferença significativa com $p < 0.05$.

Os resultados de citotoxicidade foram obtidos após a análise dos dados dos ensaios de MTT, estes demonstraram que QDA-1 inibiu 36,7% do crescimento das células VERO a 200 µM, 12,6% a 100 µM e 8,5% a 50 µM. Adicionalmente e como esperado, o DMSO não alterou o crescimento celular. A CC_{50} (concentração inibitória de 50% das células) foi estatisticamente estabelecida como $247,4 \mu\text{M} \pm 1,1 \mu\text{M}$ (erro padrão). Desta forma, observa-se que todas as concentrações estudadas tiveram efeito citotóxico em menos de 50% das células.

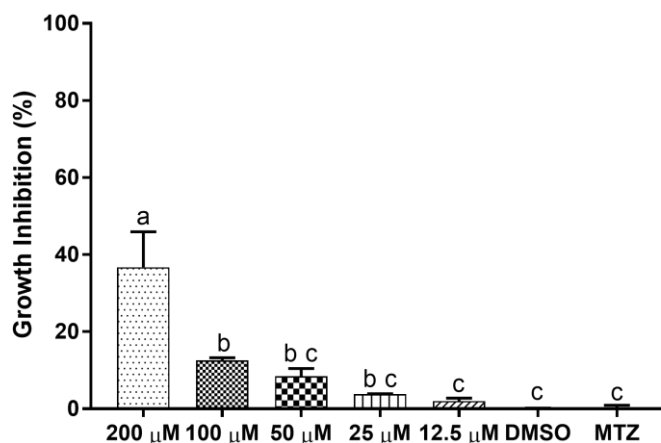


Figura 2. Citotoxicidade de QDA-1 nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µM em células VERO avaliada por ensaio de MTT após 24 h de exposição. DMSO (veículo para solubilização a 0,6%) e MTZ (metronidazol a 100 µM). Letras diferentes indicam diferença significativa com $p < 0.05$.

Os ensaios antiparasitários mostraram que o QDA-1 foi capaz de inibir completamente os trofozoítos numa concentração (160 µM) menor que a CC_{50} em células VERO ($247,4 \mu\text{M} \pm 1,1 \mu\text{M}$). Sendo assim, embora QDA-1 tenha tido um efeito levemente citotóxico nas células VERO, o MIC para atividade anti-Tv ainda está dentro de um limite que pode vir a ser determinado como seguro quando estudado em mais detalhes. Nesse sentido, uma abordagem interessante seria o estudo da nanoencapsulação dessa molécula, permitindo assim sua liberação controlada (MORA-HUERTAS et al., 2010), o que pode ajudar a diminuir os

efeitos citotóxicos observados e viabilizar sua utilização como agente tricomonicida.

4. CONCLUSÕES

Este estudo permitiu a determinação da MIC (160 μM) de QDA-1 sobre *Trichomonas vaginalis* e da CC_{50} (247,4 μM) em células VERO. Os valores encontrados demonstram que o QDA-1 tem uma atividade antiparasitária significativa contra *Trichomonas vaginalis* e que embora tenha sido observado um certo efeito citotóxico, o potencial antiparasitário deste composto ainda é claro e deve ser estudado em mais detalhes, principalmente em conjunto com metodologias que permitam a diminuição de sua citotoxicidade e permitam a sua utilização com uma alternativa viável ao tratamento da tricomoníase.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA-LIMA, G., MORAES, A.M., ARAÚJO, A. DA S., DA SILVA, E.T., DE FREITAS, C.S., VIEIRA, Y.R., MARTTORELLI, A., NETO, J.C., BOZZA, P.T., DE SOUZA, M.V.N. & SOUZA, T.M.L. (2017). 2,8-bis(trifluoromethyl)quinoline analogs show improved anti-Zika virus activity, compared to mefloquine. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 127. p. 334–340.

HAMANN, A.R., DE KOCK, C., SMITH, P.J., VAN OTTERLO, W.A.L. & BLACKIE, M.A.L. (2014). Synthesis of novel triazole-linked mefloquine derivatives: Biological evaluation against *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 24(23). p. 5466–5469.

KIRKCALDY, R.D., AUGOSTINI, P., ASBEL, L.E., BERNSTEIN, K.T., KERANI, R.P., METTENBRINK, C.J., PATHELA, P., SCHWEBKE, J.R., EVAN SECOR, W., WORKOWSKI, K.A., DAVIS, D., BRAXTON, J. & WEINSTOCK, H.S. (2012). *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD surveillance network, 2009–2010. **Emerging Infectious Diseases**. 18(6). p. 939–943.

LEITSCH, D. (2016). Recent advances in the *Trichomonas vaginalis* field. **F1000Research**. 5. p. 1–7.

MENEZES, C.B., AMANDA PICCOLI FRASSON, A.P. & TASCA, T. (2016). Trichomoniasis – are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? **Microbial Cell**. 3(9). p. 404–418.

MORA-HUERTAS, C.E., FESSI, H. & ELAISSARI, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. 385(1–2). p. 113–142.

SEÑA, A.C., BACHMANN, L.H. & HOBBS, M.M (2014). Persistent and recurrent *Trichomonas vaginalis* infections: Epidemiology, treatment and management considerations. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. 12(6). p. 673–685.

SUMANGALA, V., POOJARY, B., CHIDANANDA, N., FERNANDES, J. & KUMARI, N.S. (2010). Synthesis and antimicrobial activity of 1,2,3-triazoles containing quinoline moiety. **Archives of Pharmacal Research**. 33(12). p. 1911–1918.

WHO (2012). **Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008**. World Health Organization. p. 28p.