

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE CHALCONAS PARA TRATAMENTO DE *Trichomonas vaginalis*

BÁRBARA DA ROCHA FONSECA¹; RAQUEL NASCIMENTO DAS NEVES²;
MIRNA SAMARA ALVES DIÉ²; VITÓRIA ADRIELLY CATSCHOR DOS SANTOS²;
ÂNGELA SENA LOPES²; SIBELE BORSUK³

¹Universidade Federal de Pelotas. Curso de Biotecnologia – barbfonseca@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas. Curso de Biotecnologia – raquelnieves@hotmail.com;
mirnadie@gmail.com; vitoriacatschor@hotmail.com; angelasena@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas. Curso de Biotecnologia – sibeléborsuk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Trichomonas vaginalis é o agente etiológico da tricomoníase, doença sexualmente transmissível não-viral mais frequente do mundo, com uma estimativa de 276 milhões de novos casos ao ano (WHO, 2012). É um protozoário flagelado, anaeróbico facultativo, que infecta o trato urogenital de homens e mulheres, sendo mais comum em indivíduos do sexo feminino (89%) (LEITSCH, 2016). Pode apresentar-se de forma assintomática (80%) (ALLSWORTH et al., 2009) ou, em casos mais graves, induzir vaginite severa e infecções crônicas, podendo causar infertilidade (GRODSTEIN et al., 1993), doença inflamatória pélvica (CHERPES et al., 2006), câncer cervical e de próstata (VILKKI, 2000) e complicações durante a gravidez (PETRIN et al., 1998). Também atua como facilitador para a infecção pelo vírus HIV (VAN DER POL et al., 2008).

Seu tratamento consiste no uso de compostos da classe 5-nitroimidazóis, como o Metronidazol e o Tinidazol, únicos fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA, EUA). No entanto, esses compostos possuem alta toxicidade, ocasionando efeitos adversos durante o tratamento. Além disso, casos de resistência do parasita a esses compostos já foram relatados (LEITSCH et al., 2014), o que aumenta a necessidade de busca por novos fármacos para tratamento dessa doença.

Os compostos derivados de chalconas já apresentaram diversas atividades biológicas contra diferentes classes de microrganismos (ZHOU et al., 2015), como antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, entre outras (DÍAZ-TIELAS et al., 2016), demonstrando o alto potencial farmacológico desses compostos. Tendo em vista o amplo espectro de atividades biológicas apresentada por esses compostos, os mesmos podem representar uma classe de substâncias extremamente importante no desenvolvimento de novos fármacos com atividade antiparasitária.

A partir disso, o presente trabalho busca avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* dos compostos derivados de chalconas, a fim de verificar suas propriedades farmacológicas como uma alternativa para o tratamento da tricomoníase.

2. METODOLOGIA

Os compostos derivados de chalconas foram sintetizados pelo Laboratório de Lipidômica da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Quatro compostos, com estruturas químicas distintas, foram utilizados nesse trabalho, sendo denominados CH01, CH02, CH03 e CH04.

Para avaliar a atividade biológica *in vitro* dos compostos, foram utilizados isolados de *Trichomonas vaginalis* ATCC 30236, cultivados em meio Trypticase-extrato de levedo-maltose (TYM) (DIAMOND, 1957), sem ágar, pH= 6,0, suplementado com 10% de soro bovino adulto estéril, inativado a 56°C (POLAT, et al., 2016). As culturas foram analisadas em microscópio óptico e contadas em câmaras de Neubauer, sendo utilizadas nos ensaios apenas aquelas que apresentaram 95% de viabilidade, comprovadas por exclusão pelo corante Azul de Tripán 0,4%, sendo considerados viáveis aqueles que apresentavam ausência de coloração pelo corante. A motilidade e morfologia dos trofozoítos também foram levadas em consideração para realização dos experimentos.

Para verificação da atividade biológica dos compostos, o rastreamento farmacológico foi realizado em microplacas (96 cavidades, fundo chato - Cral®), onde os protozoários foram incubados em uma densidade de $2,6 \times 10^5$ trofozoítos/mL, juntamente aos compostos na concentração final de 100 µM, diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO 0,6%), no momento dos ensaios. Juntamente, foram realizados três controles a fim de confirmar a atividade dos compostos, sendo eles: um negativo, contendo apenas os trofozoítos vivos; um positivo, contendo Metronidazol 100µM e um controle com DMSO, não podendo exceder a concentração de 0,6% em cada cavidade, comprovando que o mesmo não interfere na morte do parasita. Todos os experimentos foram realizados três vezes e em triplicatas. As placas foram armazenadas em estufas com 5% de CO₂, à 37°C, durante 24 h.

Após o tempo de incubação do experimento realizado, os trofozoítos serão homogeneizados com Azul de Tripán (0,4%) na proporção 1:1. O preparado será contado em Câmara de Neubauer, observado em microscópio óptico (ampliação × 400) e também serão observados parâmetros como motilidade e morfologia dos trofozoítos, sendo considerados vivos aqueles que apresentarem motilidade positiva e ausência de coloração pelo corante.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad 5.0 para Windows (GraphPad Software, USA). Os dados foram submetidos à análise unidirecional da variância (ANOVA), utilizando um valor de probabilidade de $p < 0,05$. O teste de Tukey foi utilizado para identificar diferenças significativas entre as médias entre os diferentes tratamentos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos quatro compostos apresentados, todos apresentaram redução na viabilidade dos trofozoítos, conforme demonstrado na figura 1.

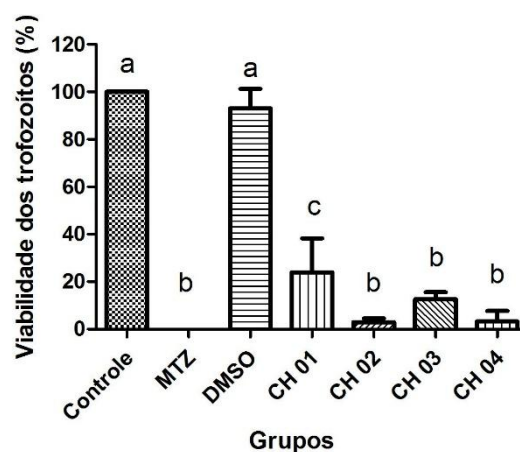


Figura 1: Screening dos compostos em *T. vaginalis* após 24h de incubação. As barras representam a viabilidade de cada trofozoíto e as letras representam as diferença significativas entre cada grupo.

Com os resultados verificados através das contagens em câmara de Neubauer após 24h, exclusão por azul de tripan e análises estatísticas após 24h, é possível observar, conforme figura 1, que os compostos CH02, CH03 e CH04 reduziram a viabilidade dos trofozoítos em 97,1%, 87,4% e 96,8%, respectivamente e não apresentando diferença significativa do controle com Metronidazol (MTZ), fármaco utilizado atualmente para o tratamento da tricomoníase, demonstrando assim que os compostos possuem atividade promissora no tratamento *in vitro* de *Trichomonas vaginalis*.

O composto CH01 reduziu a viabilidade dos trofozoítos em 76%, apresentando diferenças significativas tanto do controle negativo, quanto do controle MTZ, demonstrando que o mesmo pode apresentar resultado positivo se testado em concentrações mais altas.

Além disso, na figura 1, é possível observar que o controle DMSO 0,6% não apresentou diferença significativa do controle negativo (somente trofozoítos), demonstrando que o mesmo não interfere na atividade dos parasitas submetidos ao tratamento com os compostos.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, os compostos derivados de chalconas apresentam atividade biológica promissora em trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*. Sendo assim, novos testes deverão ser realizados, a fim de demonstrar sua concentração inibitória mínima (MIC), valor da metade da concentração inibitória (IC50), testes de citotoxicidade e mecanismo de ação dos compostos no parasita.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008. **Who**, p. 1–28, 2012.

LEITSCH, D. Recent Advances in the *Trichomonas vaginalis* Field. **F1000Research**, v. 5, p. 1–7, 2016.

ALLSWORTH, J. E.; RATNER, J. A.; PEIPERT, J. F. Trichomoniasis and other sexually transmitted infections: results from the 2001-2004 National Health and Nutrition Examination Surveys. **Sexually transmitted diseases**, v. 36, n. 12, p. 738–44, 2009.

GRODSTEIN, F.; GOLDMAN, M. B.; CRAMER, D. W. Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. **American journal of epidemiology**, v. 137, n. 5, p. 577–84, 1993.

CHERPES, T. L. et al. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. **Sexually transmitted diseases**, v. 33, n. 12, p. 747-752, 2006.



VIKKI, M. Gynaecological Infections as Risk Determinants of Subsequent Cervical Neoplasia. **Acta Oncologica**, v. 39, n. 1, p. 71–75, 2000.

PETRIN, D. et al. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 300–17, 1998.

VAN DER POL, B. et al. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, p. 548–554, 2008.

LEITSCH, D. et al. *Trichomonas vaginalis* flavin reductase 1 and its role in metronidazole resistance. **Molecular microbiology**, v. 91, n. 1, p. 198-208, 2014

ZHOU, B.; XING, C. Diverse molecular targets for chalcones with varied bioactivities. **Medical Chemistry** (Los Angeles), v. 5, n. 8, p. 388-404, 2015

DÍAZ-TIELAS, C.; GRAÑA, E.; REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M. Biological activities and novel applications of chalcones. **Planta Daninha**, v. 34, n. 3, p. 607-616, 2016

DIAMOND, L.S. The establishment of various *Trichomonas* of animals and man in axenic cultures. **J Parasitol**, v. 43, p. 488–490, 1957

POLAT, Z.A., CETIN, A., SAVAGE, P.B. Evaluation of the in vitro activity of ceragenins against *Trichomonas vaginalis*. **Acta Parasitologica**, v. 61, n. 2, p. 376-81, 2016