

AVALIAÇÃO TRICOMONICIDA DE DERIVADOS DE PIRIMIDINAS

BEATRIZ OSWALD RUTZ¹; FERNANDA KANAAN DE AZAMBUJA²; ADRIANE LEITES STROTHMANN³; LUIZA DOMINGUES MORON⁴; MIRNA SAMARA DIÉ ALVES⁵; SIBELE BORSUK⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – beatrizrutz19@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nandakanaan_02@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – adri_ane19@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – moronluiza@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – mirnadie@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – sibeleborsuk@gmail.com

1. DESCRIÇÃO DA INOVAÇÃO

Trichomonas vaginalis é um protozoário flagelado pertencente à família *Trichomonadidae*, e o causador da tricomoníase (Schwebke e Burgess, 2004). A tricomoníase consiste na infecção sexualmente transmissível (IST) não viral mais comum em todo mundo, com aproximadamente 156 milhões de novos casos anuais (WHO, 2018). Sua prevalência é maior quando comparada a outras ISTs, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), com 187 milhões de casos (WHO, 2012).

Por ser uma IST, o parasito infecta o trato urogenital de homens e mulheres, podendo causar infecções assintomáticas ou sintomáticas (Hobbs e Seña, 2013; Maritz et al., 2014). O tratamento usual é realizado atualmente a partir do metronidazol (MTZ), que apresenta boas taxas de cura para a infecção. Todavia, falhas no tratamento são observadas, muitas vezes, relacionadas à não adesão ou reinfeção (Petrin et al, 1998; Bouchemal et al. 2017), e ao fato dos efeitos colaterais do MTZ, onde tem sido relatados efeitos hematológicos e neurotóxicos. (Bouchemol et al., 2017). Além disso, a resistência medicamentosa tem sido motivo de preocupações, já que desde 1989 isolados de *T. vaginalis* têm sido encontrados com algum grau de resistência a este medicamento (Vázquez, et al., 2001).

Como alternativa a esse tratamento, a busca por moléculas sintéticas tem sido relevante na descoberta de novos fármacos por estas apresentarem diversas atividades biológicas (Guido, 2010). Dessa forma, a utilização de compostos sintéticos como possíveis formas de tratamento para a infecção é a base desta inovação. Diversas atividades biológicas já foram atribuídas às pirimidinas, inclusive com fármacos já aprovados para uso humano, como atividade anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, antiviral, aliada à necessidade de buscar novas alternativas de tratamento para a tricomoníase, para que se diminuam os efeitos colaterais e a taxa de citotoxicidade ao realizar o tratamento, avaliou-se propriedades anti-*T. vaginalis* de compostos sintéticos derivados das pirimidinas.

2. ANÁLISE DE MERCADO

As ISTs afetam a saúde e a qualidade de vida das pessoas em todo mundo. Além de facilitarem a aquisição e transmissão do HIV, além de ocasionar aos portadores sofrências como preconceito, baixa autoestima, vergonha e violência de gênero (McClelland et al., 2007; Rowley et al., 2019). Estimativas globais realizadas no ano de 2016 mostram que a tricomoníase ainda é a IST curável mais comum no mundo, com uma incidência de 156

milhões e uma prevalência de 110 milhões de casos em pessoas entre 15 e 49 anos (Who, 2018). No Brasil, o Ministério da Saúde estima uma prevalência de 15% da doença (Brasil, 2015).

Atualmente o tratamento da tricomoníase é feito com os compostos 2-metil-5-nitroimidazóis, e os únicos fármacos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA, EUA), são o Metronidazol e Tinidazol. O mais utilizado é o metronidazol, com recomendação de uso para mulheres de 500 mg duas vezes ao dia durante 7 dias e para os homens, a recomendação é de dose única de 2g (Gerwen et al., 2021). Durante o uso desta medicação, foram relatados alguns efeitos colaterais, além da possibilidade de gerar efeitos hematológicos e neurotóxicos nos indivíduos, acarretando uma maior preocupação em pacientes que sofrem de infecções recorrentes (Bouchemol et al., 2017).

Estas falhas encontradas no tratamento acarretam em um aumento do custo terapêutico com a utilização de apenas um medicamento disponível. Os custos médicos ligados à tricomoníase são estimados em US\$34.2 milhões, enquanto aqueles relacionados apenas ao risco de aumento de transmissão/aquisição do HIV é estimado em US\$167 milhões (Chapin et al., 2011; Edwards et al., 2016). Tendo em vista estas variadas intercorrências com a utilização invariável do metronidazol, demonstra-se a necessidade de busca por novos métodos farmacológicos mais inovadores como alternativa ao tratamento desses pacientes, de forma a ocasionar um tratamento mais efetivo e de baixa toxicidade, como o analisado neste produto, diminuindo assim os custos relacionados a tricomoníase.

3. ESTRATÉGIA DE DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO

Para este produto, foi avaliada a atividade de compostos sintéticos contendo o anel de pirimidina com substituições em seu radical. Na realização do estudo para a formulação desta invenção foi realizado um cultivo de isolados de *Trichomonas vaginalis* 30236 da American Type Culture Collection, e um total de 10 moléculas foram testadas, avaliando parâmetros de determinação da concentração mínima inibitória (MIC), concentração inibitória para 50% dos trofozoítos (IC50) e curva cinética de crescimento. Apenas compostos que apresentaram atividade anti-*T. vaginalis* sem diferença estatística do controle positivo (Metronidazol) seguiram para as próximas etapas do estudo. Os testes de citotoxicidade foram realizados com as linhagens celulares VERO e HmVII. Por fim, análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0, através da análise de variância de uma via (one-way ANOVA), com valor de $p < 0,05$. O teste de Tukey foi utilizado para identificar diferenças significativas entre as médias dos diferentes tratamentos.

Uma única molécula foi capaz de inibir 100% os trofozoítos, esta apresenta três átomos de cloro no carbono 4 do anel pirimidínico. Sendo assim, a utilização desta molécula foi depositada junto ao INPI, visto que após uma série de testes realizados, foi observado que esta molécula, ao ser avaliada *in vitro*, capaz de promover o efeito tricomonocida desejado e apresentaria menor citotoxicidade do que o atual único tratamento da tricomoníase, a partir do fármaco metronidazol.

4. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO

Através dos resultados do rastreamento dos compostos em 100 µM (figura 1), apenas o composto 4 foi capaz de reduzir 100% a viabilidade dos trofozoítos quando comparado com o controle negativo, não apresentando diferença estatística d.o controle positivo, em que foi adicionado Metronidazol 100 µM.

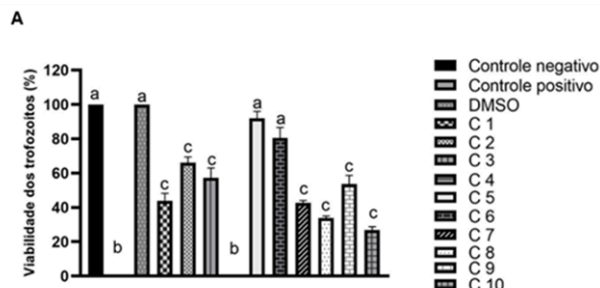


Figura 1:- Viabilidade dos trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* na concentração de 100 µM de compostos derivados das pirimidinas.

Na figura 2, podemos observar que a concentração mínima inibitória (MIC) atribuída ao composto foi de 60 µM, inibindo completamente o crescimento dos trofozoítos, com exposição de 24 horas. A concentração capaz de inibir 50% dos trofozoítos foi inferior a 10 µM.

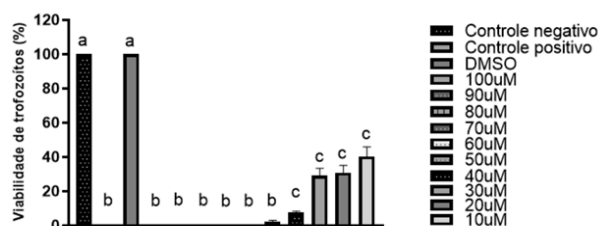


Figura 2:- Determinação da concentração inibitória mínima e MIC de isolado de *Trichomonas vaginalis* após tratamento com o C4 após 24h nas concentrações de 100 µM a 10 µM.

Por fim, através do ensaio de citotoxicidade, apresentado pela figura 3, observa-se que na linhagem VERO a viabilidade das células permaneceu em 70%, enquanto a linhagem HMVII apresentou viabilidade de 79%, indicando que o composto não apresentou-se citotóxico, mesmo em concentrações superiores. Com relação a concentração apresentada como MIC (60 µM), não verificou-se diferença estatística do controle negativo, o que demonstra que a molécula referente ao composto 4 apresenta um potencial promissor para tratamento alternativo contra a tricomoníase, dada sua baixa citotoxicidade

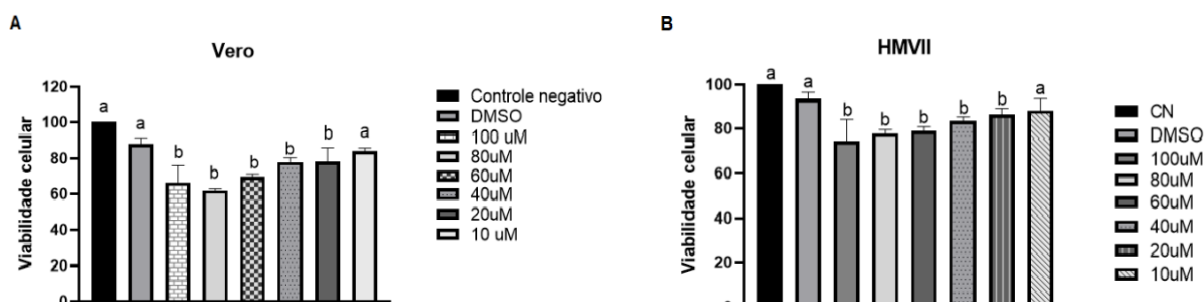


Figura 3: Efeito da citotoxicidade em células VERO e HMVII tratadas com o composto C4 e em diferentes concentrações.

5. CONCLUSÕES

O rastreamento farmacológico *in vitro* de 10 compostos sintéticos derivados das pirimidinas encontrou um composto (C4) com atividade anti-*T. vaginalis*, apresentando MIC de 60 µM e IC 50 de 9.27 µM, sem retorno de crescimento quando avaliado por até 96 horas. O composto C4 não apresentou-se citotóxico nas linhagens celulares VERO e HMVII, o que indica que este é um composto com potencial promissor para o tratamento da tricomoníase, com provável menor toxicidade a depender da forma de uso, necessitando de outras pesquisas com este enfoque.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Schwebke, J. R.; Burgess, D. (2004) 'Trichomoniasis', *Clinical Microbiology Reviews*, 17, pp. 794–803.
- World Health Organization (2018). **Report on global sexually transmitted infection surveillance. World Health Organization. World Health Organization (WHO). Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections: 2008:** World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, 2012 ISBN 16 978 92 4 150383 9. *Reproductive health matters*, v.20, n.40, p.207-209, 2012.
- HOBBS, M.M.; SEÑA, A. C. (2013) 'Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection', *Sexually Transmitted Infections*, 89(6), pp. 434–438. doi: 10.1136/sextrans-2013-051057.
- Petrin, D. . et al. (1998) 'Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*', *Clinical Microbiology Reviews*, 11, pp. 300–317.
- BOUCHEMAL, K., BORIES, C. and Loiseau, P. M. (2017) 'Strategies for Prevention and Treatment of *Trichomonas vaginalis* Infections', *Clinical Microbiology Reviews*, 30(3), pp. 811–825.
- Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G. (2010) 'Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas', *Dossiê Biotecnologia*, 24, pp. 81–98. doi: 10.1590/S0103-40142010000300006.
- Vázquez, F. et al. (2001) 'Trichomonas vaginalis: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 19(3), pp. 114– 124. doi: 10.1016/S0213-005X(01)72580-3.
- McClelland, R. S. et al. (2007) 'Infection with *Trichomonas vaginalis* Increases the Risk of HIV-1 Acquisition', *The Journal of Infectious Diseases*, 195(5), pp. 698–702. doi: 10.1086/511278.
- Gerwen, O. T. V. . et al. (2021) 'Epidemiology, Natural History, Diagnosis, and Treatment of *Trichomonas vaginalis* in Men', *Clinical Infectious Diseases*, 73(6), pp. 1119–1124.
- Chapin, K.; Andrea, S. (2011) 'APTIMA® *Trichomonas vaginalis*, a transcriptionmediated amplification assay for detection of *Trichomonas vaginalis* in urogenital specimens', *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 11(7), pp. 679–688. doi: 10.1586/erm.11.53.
- Edwards, T. et al. (2016) 'Trichomonas vaginalis: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis', *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), pp. 406–417. doi: 10.3109/1040841X.2014.958050.
- Jung, O.; Smeets, R.; Hartjen, P.; Schnettler, R.; Feyerabend, F.; Klein, M.; et al. (2019) 'Improved in vitro test procedure for full assessment of the cytocompatibility of degradable magnesium based on ISO 10993-5/-12' *International Journal of Molecular Sciences*, 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20020255> PMID: 30634646
- Rowley, J.; Vander Hoorn S.; Korenromp, E.; Low, N.; Unemo, M.; Abu-Raddad, L. J.; Chico, R. M.; Smolak, A.; Newman, L.; Gottlieb, S.; Thwin, S. S.; Broutet, N.; Taylor, M. M. (2019) 'Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016', *Bulletin of the World Health Organization*, 97(8), pp. 548–562.