

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE FARMÁCIA

Marina Rocha Azevedo

Avaliação da atividade antiplasmodial de compostos sintéticos derivados de triazóis e aminoquinolinas e padronização do ensaio de SYBR Green para teste de drogas

Juiz de Fora
2018

Marina Rocha Azevedo

Avaliação da atividade antiplasmodial de compostos sintéticos derivados de triazóis e aminoquinolinas e padronização do ensaio de SYBR Green para teste de drogas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Graduação da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para obtenção do título de Farmacêutico.

Orientadora: Profa. Dra. Kézia Katiani Gorza Scopel

Coorientador: Prof. Dr. Adilson David da Silva

Juiz de Fora

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Azevedo, Marina Rocha.

Avaliação da atividade antiplasmodial de compostos sintéticos derivados de triazóis e aminoquinolinas e padronização do ensaio de SYBR Green para teste de drogas / Marina Rocha Azevedo. -- 2018. 46 p. : il.

Orientadora: Kézia Katiani Gorza Scopel

Coorientador: Adilson David da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, 2018.

1. Malária. 2. Aminoquinolinas. 3. Triazóis. 4. Citotoxicidade. 5. SYBR Green. I. Scopel, Kézia Katiani Gorza, orient. II. Silva, Adilson David da, coorient. III. Título.

Marina Rocha Azevedo

Avaliação da atividade antiplasmodial de compostos sintéticos derivados de triazóis e aminoquinolinas e padronização do ensaio de SYBR Green para teste de drogas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Graduação da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para obtenção do título de Farmacêutico.

Orientadora: Profa. Dra. Kézia Katiani Gorza Scopel

Coorientador: Adilson David da Silva

Aprovada em 04 de Julho de 2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kézia Katiani Gorza Scopel - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Professora Dra. Clarice Abramo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Farmacêutica Dra. Roberta Reis Soares
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter permitido que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, por sempre terem confiado e acreditado em mim e serem a minha melhor torcida.

Ao meu irmão, Daniel, por todo companheirismo e amizade.

À minha avó, Beatriz, por todo carinho e dedicação.

Ao Rodrigo, por ser meu confidente e companheiro para todas as horas.

Aos meus amigos, que participaram de toda essa caminhada junto comigo, me incentivando.

Aos professores que por mim passaram, por terem contribuído com a minha formação.

À professora Kézia Scopel, em especial, pela oportunidade que me deu há quatro anos de conhecer o mundo da pesquisa e por sempre ter estado presente durante esse tempo de aprendizado.

Ao professor Adilson pela parceria nesse trabalho.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Parasitologia, por todos os momentos compartilhados, em especial aos meus braços direito e esquerdo dentro do laboratório, Carol e Lívia.

Aos órgãos UFJF, FAPEMIG, CNPQ e CAPES pelo fomento que possibilitou a minha pesquisa.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a profissional que eu me tornei.

RESUMO

A malária ainda é considerada um grande problema de saúde pública. O elevado número de casos e óbitos provocados pela doença, aliado aos casos de resistência aos antimaláricos hoje conhecidos, torna urgente a busca por novas moléculas que sejam efetivas contra as formas hepáticas e sanguíneas dos parasitos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar, *in vitro*, o potencial antiplasmodial e citotóxico de cinco moléculas, derivadas de triazóis e de aminoquinolinas. Apenas duas, ART 59 e ART 65, das cinco moléculas avaliadas demonstraram boa atividade antiplasmodial. Contudo, apenas ART 59 foi considerada seletiva para o parasito (IS>10). Portanto, apenas o composto ART 59 pode ser considerado uma molécula promissora como protótipo de estudo para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos. Além desse objetivo, o presente trabalho buscou padronizar o ensaio SYBR Green, a fim de utilizar essa metodologia para testes de drogas em *P. falciparum*. Foram analisadas quatro variáveis, o hematócrito (1 ou 2%), a presença de fenol no meio de cultura, o tempo de incubação (48 ou 72h) e o ganho colocado no aparelho no momento da leitura baseada em densidade óptica. As melhores condições foram, então, estabelecidas como metodologia padrão a ser utilizada em futuros ensaios de quimioterapia antimalárica.

Palavras-chave: Malária, Aminoquinolinas, Triazóis, Citotoxicidade, SYBR Green.

ABSTRACT

Malaria is still considered a major public health problem. The high number of cases and deaths caused by the disease, together with the cases of resistance to antimalarials known today, makes it urgent to search for new molecules that are effective against the hepatic and blood forms of the parasites. In this context, the present work aimed to evaluate, in vitro, the antiplasmodial and cytotoxic potential of five molecules, derived from triazoles and aminoquinolines. Only two, ART 59 and ART 65, of the five molecules evaluated demonstrated good antiplasmodial activity. However, only ART 59 was considered selective for the parasite (IS > 10). Therefore, only the ART 59 compound can be considered a promising molecule as a study prototype for the development of antimalarial drugs. In addition to this objective, the present work sought to standardize the SYBR Green assay in order to use this methodology for drug testing in *P. falciparum*. Four variables, hematocrit (1 or 2%), the presence of phenol in the culture medium, the incubation time (48 or 72h) and the gain placed in the apparatus at the time of reading based on optical density were analyzed. The best conditions were then established as the standard methodology to be used in future antimalarial chemotherapy trials.

Keywords: Malaria, Aminoquinoline, Triazole, Citotoxicity e SYBR Green.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Países endêmicos de malária em 2000 e 2016.....	12
Figura 2. Mapa de risco da malária no Brasil, 2015.....	13
Figura 3. Ciclo de vida dos plasmódios.....	14
Figura 4. Representação esquemática dos alvos dos principais antimaláricos esquizotônicos em <i>Plasmodium</i> spp.	16
Figura 5. Estrutura química dos antimaláricos derivados de quinolinas.....	23
Figura 6. Estrutura química dos anéis de triazol.....	24
Figura 7. Cultura de <i>P. falciparum</i> antes (A) e após (B) sincronização.....	27
Figura 8. Desenho esquemático das placas de 96 poços no experimento.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva dose-resposta de ART 59 contra <i>P. falciparum</i> (3d7).....	30
Gráfico 2. Curva dose-resposta de ART 65 contra <i>P. falciparum</i> (3d7).....	31
Gráfico 3. Curva dose-resposta de CQ contra <i>P. falciparum</i> , utilizando-se RPMI com fenol, hematócrito de 1% e 48h de incubação.....	39
Gráfico 4. Curva dose-resposta de CQ contra <i>P. falciparum</i> , utilizando-se RPMI com fenol, hematócrito de 2% e 72h de incubação.....	39
Gráfico 5. Curva dose-resposta de CQ contra <i>P. falciparum</i> , utilizando-se RPMI com fenol, hematócrito de 2%, 72h de incubação e ganho de 60 na leitura, no primeiro experimento. ...	40
Gráfico 6. Curva dose-resposta de CQ contra <i>P. falciparum</i> , utilizando-se RPMI com fenol, hematócrito de 2%, 72h de incubação e ganho de 60 na leitura, no segundo experimento.....	41
Gráfico 7. Curva dose-resposta de CQ contra <i>P. falciparum</i> , utilizando-se RPMI com fenol, hematócrito de 2%, 72h de incubação e ganho de 60 na leitura, no terceiro experimento.....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estruturas dos compostos testados.....	24
Quadro 2. Taxa de inibição de crescimento, em porcentagem, de formas sanguíneas de <i>P. falciparum</i> dos compostos derivados de aminoquinolinas.....	30
Quadro 3. IC ₅₀ , CC ₅₀ e índice de seletividade dos compostos ART 59 e ART 65	31
Quadro 4. Padronização do ensaio de SYBR Green baseada na atividade antiplasmodial (IC ₅₀) da Cloroquina sob diferentes condições de cultivo.	37
Quadro 5. Comparação da atividade antiplasmodial (IC ₅₀) da Cloroquina em diferentes situações testadas em três repetições.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ART	Código da Droga
CC	<i>Citotoxic Concentration</i> , Concentração Citotóxica
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> , Ácido Desoxiribonucleico
HepG2	Linhagem celular de Hepatocarcinoma Humano
IC	Concentração Inibitória
IS	Índice de seletividade
µg	Micrograma
mg	Miligrama
µL	Microlitro
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
MTT	Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazol
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Tampão Salino Fosfatado
RPMI	Meio Roswell <i>Park Memorial Institute</i>
WHO/OMS	World Health Organization, Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 MALÁRIA.....	12
1.2 CICLO DE VIDA DO PARASITO	14
1.3 TRATAMENTO ANTIMALÁRICO	15
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL E CITOTÓXICA DE COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE TRIAZÓIS E DERIVADOS DE AMINOQUINOLINAS	22
4.1 INTRODUÇÃO	22
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.2.1 Compostos testados	24
4.2.2 Ensaio biológicos	26
4.2.2.1 <i>Avaliação do potencial antiplasmodial</i>	26
4.2.2.1.1 Cultivo de rotina.....	26
4.2.2.1.2 Ensaio quimioterápicos	27
4.2.2.2 <i>Ensaio de citotoxicidade</i>	28
4.2.3 Determinação do índice de seletividade	29
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.4 CONCLUSÃO	33
5 CAPÍTULO 2: PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE SYBR GREEN PARA QUIMIOTERAPIA ANTIMALÁRICA IN VITRO	34
5.1 INTRODUÇÃO	34
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.4 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43

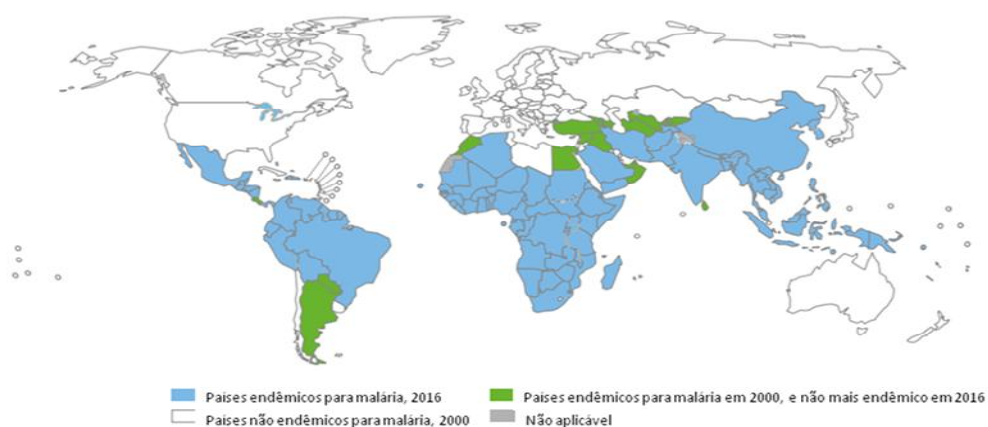
1 INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa e seu agente etiológico são protozoários do gênero *Plasmodium*. A doença é transmitida pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* infectada com o parasito. Para o homem, as espécies infectantes são *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, sendo as duas primeiras espécies mais prevalentes no mundo e *P. falciparum* responsável pelo maior número de casos de malária grave (WHO, 2015a).

Apesar de haver tratamento eficaz e medidas profiláticas efetivas contra a doença, a malária continua afetando gravemente a saúde das pessoas no mundo todo, especialmente de classes econômicas baixas que vivem em áreas de risco para a aquisição da doença (WHO, 2015a). Segundo o relatório da Organização Mundial da saúde (2017), estima-se que, no ano de 2016, 216 milhões de casos clínicos de malária ocorreram em todo o mundo contabilizando 445 000 mortes atribuídas à doença, sendo a Região Africana responsável por 90% dos casos e 91% das mortes (WHO, 2017b). A **Figura 1** mostra os países endêmicos de malária no mundo.

Figura 1. Países endêmicos de malária em 2000 e 2016.



Fonte: WHO, 2016.

Entre 2014 e 2016, a taxa de incidência de casos de malária permaneceu inalterada globalmente, mas aumentou substancialmente na Região das Américas (36%), sendo causados principalmente por *P. vivax* (WHO, 2017b) A maioria dos casos de malária na América do Sul ocorre na Região Amazônica e, em 2015, o Brasil foi responsável por 24% dos casos de malária nas Américas (RECHT *et al*, 2017).

No Brasil, a década de 70 foi um período de grande disseminação da malária. Em parte, isso deveu-se ao modelo da "zona econômica livre" na Amazônia, o qual incentivou a

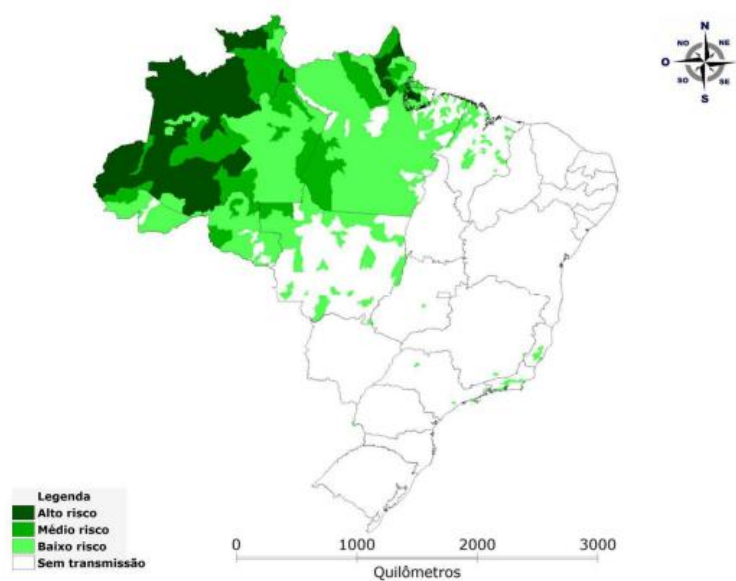
implantação de empresas multinacionais na região devido, sobretudo, à política de isenção de impostos. O resultado foi ondas de migração descontroladas para o interior do Amazonas e para a periferia da cidade de Manaus, levando a um aumento gradual da transmissão da malária nas áreas periurbanas, o que é verificado até hoje (RECHT *et al*, 2017). Na década de 90, o número de episódios de malária apresentou um crescimento alarmante, atingindo, em 1996, 632.813 casos. A região da Amazônia Legal foi responsável por 99,7% desses casos (OLIVEIRA-FERREIRA *et al*, 2010).

Em 2003, o Ministério da Saúde implantou o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNPCM), a fim de diminuir o número de internações e óbitos resultantes da malária e manter a ausência de transmissão nas localidades onde ela já havia sido interrompida (FERREIRA *et al*, 2016). Em 2011, verificou-se a redução de 40% na incidência da malária no país e queda no número de internações (MONTEIRO *et al*, 2013).

Em 2014, o Brasil notificou o menor número de casos de malária desde a década de 80. Foram 143.910 casos confirmados e apenas 41 óbitos. Em novembro de 2015, o país recebeu o Prêmio Campeão das Américas, da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), e o Ministério da saúde lançou o Plano de Eliminação da Malária no Brasil, o qual se insere nos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável lançados pelas Nações Unidas. O objetivo das Nações Unidas é reduzir o número global de casos de malária em 90% até 2030 e, possivelmente, eliminar a malária em 35 países (FERREIRA *et al*, 2016).

A **Figura 2** mostra as regiões endêmicas de malária no Brasil.

Figura 2. Mapa de risco da malária no Brasil, 2015.

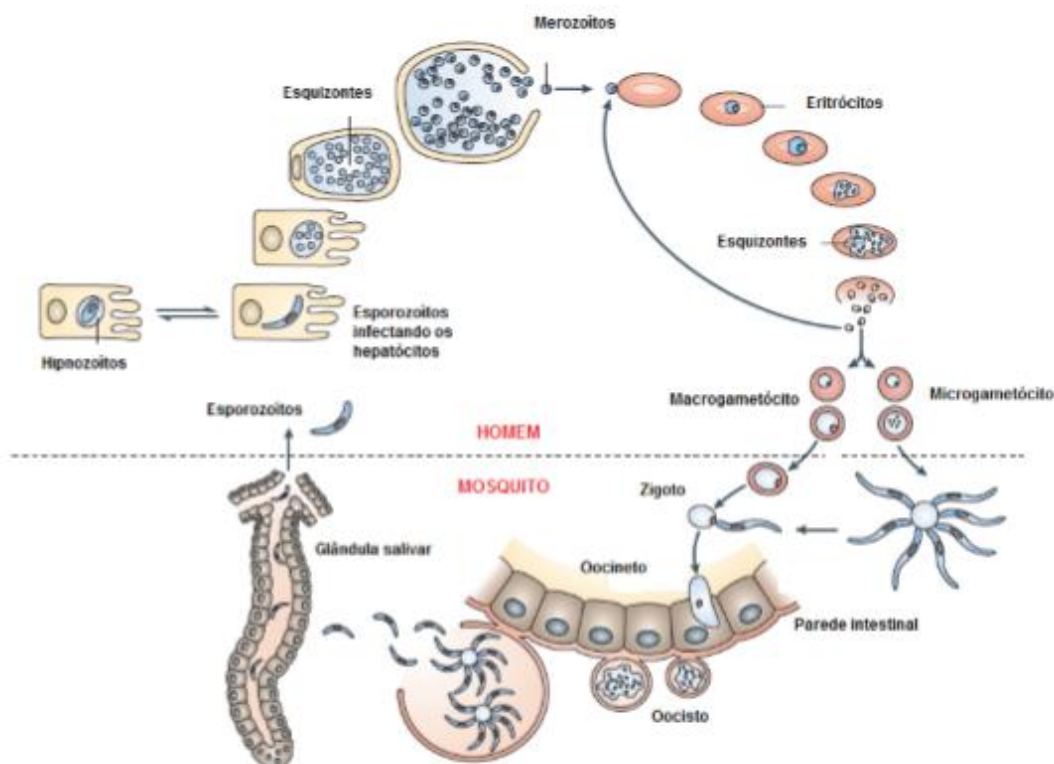


Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS.

1.2 CICLO DE VIDA DO PARASITO

O ciclo de vida do *Plasmodium* é caracterizado por uma fase sexuada exógena esporogônica, que ocorre em mosquitos do gênero *Anopheles*, e uma fase assexuada esquizogônica, que ocorre no hospedeiro vertebrado (ANTINORI *et al*, 2012) (**Figura 3**).

Figura 3. Ciclo de vida dos plasmódios



Fonte: Adaptada de WEELS, ALONSO e GUTTERIDGE, 2009

No homem, o ciclo se inicia quando a fêmea do mosquito *Anopheles* infectada com o parasito inocula, durante sua picada, os esporozoítos na derme ou diretamente na corrente sanguínea do hospedeiro. Os esporozoítos migram pela corrente sanguínea até alcançar o fígado onde invadirão os hepatócitos. Dentro dessas células os esporozoítos se multiplicarão e se diferenciarão em esquizontes e, em seguida, em milhares de merozoítos hepáticos, os quais são liberados, em merossomos, para o sangue onde iniciarão a fase sanguínea. Para as espécies *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos poderão permanecer em estágio de latência no fígado, sendo denominados hipnozoítos. Estes serão os responsáveis por episódios de recaídas tardias da doença, os quais ocorrerão dentro de semanas, meses ou mesmo anos após a infecção primária (SOULARD *et al*, 2015).

Na fase sanguínea, os merozoítos, após invadir os eritrócitos, darão origem aos trofozoítos, os quais amadurecem no decorrer de 24 a 72 horas, dependendo da espécie de plasmódio causadora da doença, produzindo esquizontes sanguíneos. Esses esquizontes amadurecem e diferenciam em merozoítos que invadem outros eritrócitos, fazendo com o que o ciclo se repita continuamente em intervalos definidos de tempo (ANTINORI *et al*, 2012). Após alguns ciclos, alguns merozoítos se diferenciam em formas sexuadas denominadas gametócitos. As formas sexuadas, encontradas no interior das hemácias, ao serem ingeridas pelo mosquito vetor, dão início ao ciclo sexuado do parasito no hospedeiro invertebrado (Brasil, 2010).

É importante ressaltar que é na fase sanguínea que surgem os sintomas clínicos da doença. A ruptura dos esquizontes libera hemozoína, ou pigmento malárico, o qual é responsável pelo aparecimento do paroxismo febril da malária, caracterizado por 3 estágios: o primeiro estágio consiste no rápido aumento da temperatura associado a calafrios; o segundo é marcado por um pico de temperatura, dor de cabeça, vasodilatação e mialgias; e o terceiro é o estágio de defervescência. O paroxismo febril tem duração clássica de 8 a 12 horas, dependendo da espécie de *Plasmodium* (ANTINORI *et al*, 2012).

Quando não há um tratamento adequado, a malária pode evoluir para a sua forma grave. As principais alterações clínico-patológicas presentes nessa forma da doença são: o acometimento do sistema nervoso central; a anemia grave; a insuficiência renal; a disfunção pulmonar; o choque; a coagulação intravascular disseminada; a hipoglicemia; a acidose metabólica e a disfunção hepática (GOMES *et al*, 2011).

Diante da gravidade do caso clínico que a doença pode causar, é essencial o acesso rápido, universal e gratuito ao diagnóstico parasitológico da doença, a fim de identificar sua espécie causadora. As técnicas de diagnóstico disponíveis são: gota espessa; esfregaço fino; reação em cadeia da polimerase (PCR); e testes de diagnóstico rápido (RDT) (ABBA *et al*, 2011).

1.3 TRATAMENTO ANTIMALÁRICO

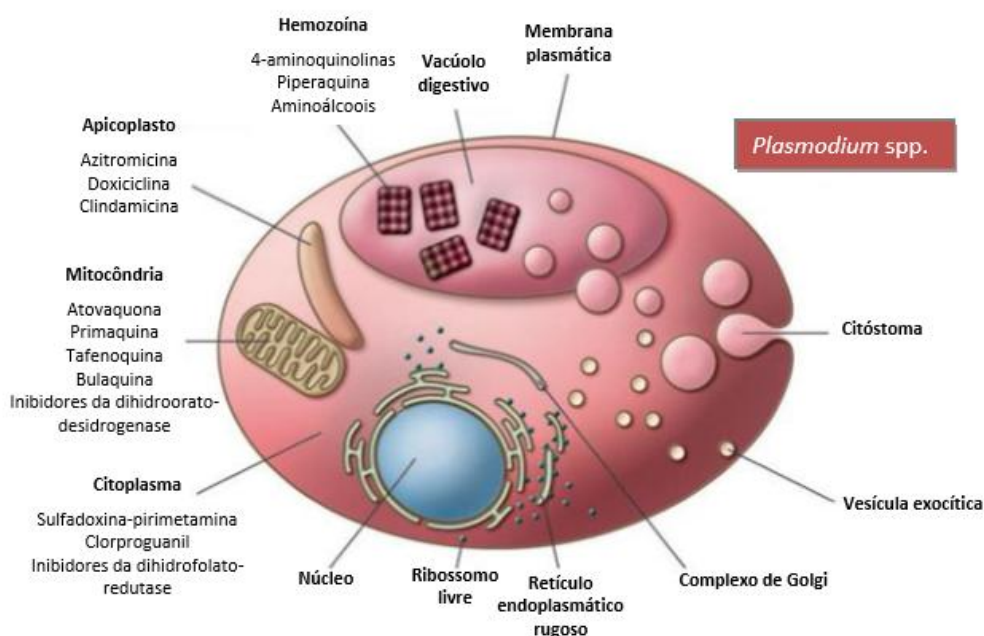
A malária é uma importante causa de morte dentre crianças e adultos residentes em países onde a mesma é endêmica. Seu controle requer uma abordagem conjunta de prevenção e tratamento imediato, com compostos antimaláricos efetivos (WHO, 2015). O tratamento adequado da doença, ou seja, seguindo dosagem e tempo recomendados, objetiva

assegurar uma cura clínica rápida e duradoura; evitar a aparição das formas graves da doença; e impedir o desenvolvimento da resistência medicamentosa (OSÓRIO-DE-CASTRO *et al*, 2011).

O tratamento da malária pode objetivar interromper a esquizogonia sanguínea, destruir os hipnozoítos (formas latentes do parasito no fígado somente para as espécies *P. vivax* e *P. ovale*) a fim de evitar o aparecimento de recidivas, ou impedir o desenvolvimento de formas sexuadas, impossibilitando a transmissão dos parasitos (BRASIL, 2010).

A maioria dos antimaláricos atua na fase eritrocítica dos parasitos. Esses fármacos esquizonticidas sanguíneos podem pertencer às classes das quinolinas, aminoálcoois, sulfonamidas, biguanidas, diaminopirimidinas, lactonas sesquiterpênicas, naftoquinonas e antibióticos (SOUZA, 2015). Alguns alvos desses esquizonticidas sanguíneos se encontram representados na **Figura 4**.

Figura 4. Representação esquemática dos alvos dos principais antimaláricos esquizonticidas em *Plasmodium* spp.



Fonte: Adaptado de Greenwood et al, 2008.

Para o tratamento da malária não complicada causada por *P. falciparum*, a terapia indicada atualmente é a combinação de um composto derivado de artemisinina, tendo em vista sua rápida ação contra o parasito, associado a outro composto de ação mais longa. Essa é a chamada terapia de combinação de derivados de artemisinina ou *Artemisinin Combination*

Therapy (ACT). O primeiro atua nas formas sanguíneas assexuadas e também é ativo contra as formas sexuadas do parasito. Já os fármacos de ação mais prolongada são responsáveis por agir contra as outras formas do parasito e fornecer proteção contra o desenvolvimento de resistência ao derivado de artemisinina (WHO, 2015b). Exemplos dessas combinações de fármacos são artemeter + lumefantrina, artesunato + amodiaquina, artesunato + mefloquina e diidroartemisinina + piperaquina.

Para os casos de malária grave causada por *P. falciparum* é recomendado o tratamento parenteral com derivados de artemisinina, como artesunato ou artemeter, ou alcaloides de cinchona, como quinina ou quinidina, seguido por dose de ACT via oral. Se não for corretamente tratada, na maioria dos casos a malária grave é fatal (WHO, 2015b).

Contudo, para alguns grupos de pacientes, como crianças pequenas, a terapêutica pode não funcionar, pois a farmacocinética das drogas é diferente. Para isso, as soluções seriam aumentar a dose do medicamento, aumentar a frequência ou duração da dosagem, ou adicionar um novo antimalárico ao tratamento. Deve-se ter cuidado com o aumento de dose de alguns fármacos, pois pode-se chegar a uma dosagem tóxica para o paciente (WHO, 2015b).

Nos casos de malária não complicada ocasionada por *P. vivax*, a cloroquina é o fármaco de escolha para atuar nas formas sanguíneas do parasito, pois essa espécie permanece sensível a essa droga na maioria dos países endêmicos. Para atingir os hipnozoítos, formas latentes presentes no interior dos hepatócitos, os compostos utilizados pertencem à classe das 8-aminoquinolinas, sendo a primaquina o fármaco de escolha (WHO, 2015b).

A eficácia de muitos medicamentos antimaláricos é limitada pela resistência que os parasitos desenvolvem a esses medicamentos, e esta resistência já foi descrita para quase todas as drogas disponíveis atualmente (CUI *et al*, 2015). Segundo a OMS, o conceito de resistência é a capacidade que o parasito tem de sobreviver e multiplicar-se mesmo quando o medicamento é administrado como previsto nas diretrizes de tratamento, ou em doses superiores, mas ainda tolerada pelo indivíduo (WHO, 2010). Vários são os fatores responsáveis pelo surgimento da resistência a fármacos, como a concentração do antimalárico a qual os parasitos estão expostos, o número de parasitos expostos, a presença de outros fármacos no sangue, aos quais o parasito não é resistente e a tolerância do paciente ao medicamento (WHO, 2017a).

O desenvolvimento da resistência acontece graças a ocorrência de dois eventos: a mutação genética, que produz uma cepa resistente; e o subsequente processo de seleção, em que ocorre a transmissão preferencial da cepa resistente devido à vantagem de sobrevivência

na presença do medicamento antimalárico (WHO, 2015b). Dentre os medicamentos cuja resistência é conhecida, a cloroquina é a que possui história e causas mais difundidas. A resistência à cloroquina surgiu em 1950, e consiste, a nível molecular, em alterações de aminoácidos na proteína transmembrana PfCRT do vacúolo digestivo (PETERSEN, 2015). Desde a descoberta do transportador PfCRT como determinante genético primário da resistência à cloroquina em *P. falciparum*, 53 isoformas dessa proteína foram encontradas expressas em isolados de parasitas de todo o mundo (CALLAGHAM, 2016). O transportador mutante atua excretando a cloroquina do vacúolo, conferindo, assim, a resistência. A diminuição da concentração de cloroquina intravesicular também promove a conversão de hematina altamente tóxica em hemozoína, gerando resistência a outras drogas antimaláricas (JUGE *et al*, 2017).

A resistência à terapia combinada a artemisinina, caracterizada pela depuração lenta do parasito, foi relatada pela primeira vez no Camboja, em 2009, e é consequência de mutações na hélice do gene kelch13 (k-13) (CERQUEIRA *et al*, 2017). Tal gene codifica uma proteína kelch putativa e foi demonstrado, em estudo de estruturação proteica, que essas mutações podem alterar a função biológica dessa proteína putativa. Mais de 30 polimorfismos de nucleotídeo único na região da hélice de Pfk-13 foram associados à resistência à artemisinina (MISHRA *et al*, 2015).

Em áreas onde os tratamentos recomendados ainda são eficazes, para dificultar o surgimento de parasitos resistentes aos antimaláricos, é preciso promover um diagnóstico preciso da espécie causadora da infecção, o uso correto dos medicamentos, um tratamento com qualidade assegurada e uma boa adesão à terapia prescrita. Além disso, o controle vetorial deve ser realizado, a fim de se reduzir o número de parasitos expostos a um fármaco e, conseqüentemente, o risco de resistência. (WHO, 2017a).

A farmacovigilância avançada e a vigilância da eficácia dos antimaláricos são essenciais para detectar eventos adversos e eficácia reduzida, objetivando a seleção de terapias mais assertivas para as políticas nacionais de tratamento, e devem ser realizadas a cada dois anos para as terapias de malária de primeira linha (WHO, 2015a). Além disso, estudos sobre a influência da resistência de medicamentos na capacitação parasitária auxiliam na identificação de estratégias de dosagem ótimas e estudos sobre como os mosquitos medeiam a propagação da resistência aos medicamentos podem ajudar a dissuadir a propagação da resistência (CUI *et al*, 2015)

No Brasil, o Ministério da Saúde disponibiliza gratuitamente os medicamentos antimaláricos utilizados em território Nacional através do Sistema Único de Saúde (SUS),

revisa e avalia a eficácia dos medicamentos utilizados, a fim de evitar casos de resistência aos antimaláricos e garantir um tratamento de melhor qualidade à população afetada pela malária no Brasil (BRASIL, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Embora tenha havido avanços no controle da malária nos últimos anos, esta doença ainda é um dos principais problemas de saúde pública mundial, sendo responsável por 445.000 mortes em todo o mundo no ano de 2016 (WHO, 2017b).

O tratamento adequado é hoje um dos principais alicerces para o controle da doença, aliado ao diagnóstico rápido e preciso e ao combate ao mosquito vetor. No entanto, a eficácia de muitos medicamentos antimaláricos é limitada pela resistência dos parasitos aos medicamentos, e esta já foi descrita para quase todos os fármacos disponíveis para o tratamento atualmente (CUI *et al*, 2015).

Apesar dos esforços para descobrir novos fármacos antiplasmodiais e a implementação de combinações terapêuticas para o tratamento da malária, os plasmódios estão constantemente se adaptando e desenvolvendo mecanismos de resistência contra os compostos usados no tratamento da doença. Isso ocorre devido a grande diversidade genética dos parasitos, explicada pelas altas taxas de mutações em seu genoma, e ao baixo número de parasitos transportados por indivíduos infectados, o que favorece o carreamento dos parasitos por longos períodos na ausência de sintomas (PRADINES, B. *et al*, 2010).

Diante do elevado impacto social que a doença determina e do crescente número de casos de resistência aos antimaláricos disponíveis no mercado, tem-se buscado o descobrimento/desenvolvimento de novos fármacos capazes de eficientemente combater a malária. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar, *in vitro*, o potencial antimalárico e a citotoxicidade de compostos derivados de triazóis e aminoquinolinas, a fim de verificar se os mesmos apresentam potencial para atuarem contra a doença. Além disso, o estudo traz a padronização de um método para testes de drogas, *in vitro*, que busca otimizar a busca por novos antimaláricos.

3 OBJETIVOS

Avaliar, *in vitro*, a atividade antiplasmodial de compostos sintéticos derivados de triazóis e aminoquinolinas.

Padronizar o ensaio *in vitro*, SYBR Green, para uso em teste de drogas contra *P. falciparum*

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de moléculas derivadas de triazóis e derivadas de aminoquinolinas sobre as células HepG2 e Hela.

Avaliar, *in vitro*, a atividade e o índice de seletividade de moléculas derivadas de triazóis e derivadas de aminoquinolinas sobre formas sanguíneas assexuadas de *P. falciparum* cloroquina sensível (cepa 3D7).

4 CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL E CITOTÓXICA DE COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE TRIAZÓIS E DERIVADOS DE AMINOQUINOLINAS

4.1 INTRODUÇÃO

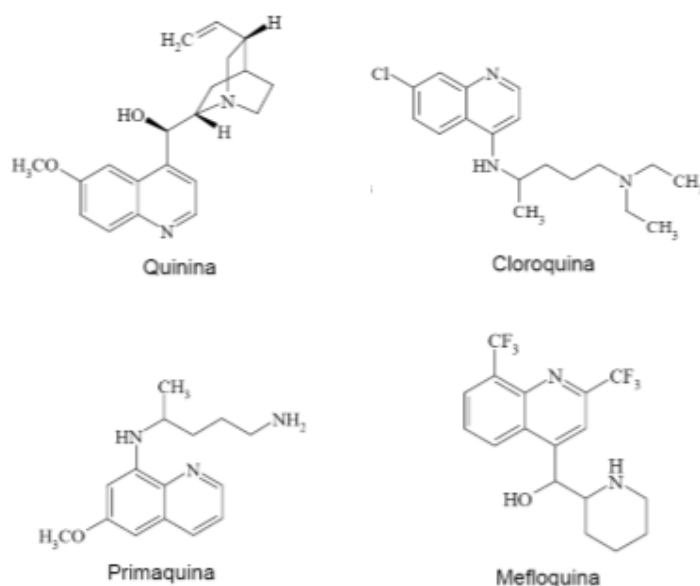
A eficácia de um antimalárico é dada a partir das interações entre o medicamento e o plasmódio – toxicidade seletiva e resistência aos medicamentos – e entre o medicamento e o hospedeiro através da farmacocinética e da farmacodinâmica. Um medicamento ideal é seletivo para o parasito e apresenta atividade curativa sem ou com mínima toxicidade para o hospedeiro (DESHPANDE *et al*, 2016).

Os compostos que apresentam o grupo quinolina são antimaláricos clássicos, muito antigos no combate à malária e sua síntese é fácil e barata (SOUZA *et al*, 2011).

A história dos medicamentos antimaláricos baseados em quinolina partiu do alcalóide quinina, cuja fonte natural é a árvore de Cinchona. A casca da árvore de Cinchona foi usada para curar a malária pela primeira vez em 1630, pela Condessa de Chinchon, o que deu nome a árvore de Cinchona (MANZLOOR *et al*, 2017). Em 1920, a quinina foi substituída pela cloroquina, uma droga sintética de maior eficácia contra os plasmódios. Porém, o extensivo e desordenado uso da cloroquina levou, no fim dos anos 1950, ao surgimento de cepas de *P. falciparum* resistente a esse medicamento, no Sudeste Asiático, Oceania e América do Sul (YEO *et al*, 2017). Atualmente, poucos países utilizam esse medicamento com propósito terapêutico contra a malária falciparum, sendo seu uso quase que restrito a outras espécies de parasitos do gênero *Plasmodium*.

Os membros da família da quinolina incluem além da cloroquina, a mefloquina e a primaquina (**Figura 5**). Os dois primeiros são derivados de 4-aminoquinolinas, que atuam inibindo a formação de hematina por complexação com a ferriprotoporfirina IX, o que impede a formação de hemozoína, também chamada de pigmento malárico, levando o parasito à morte (DESHPANDE *et al*, 2016). Já a primaquina, uma 8-aminoquinolina, atua nos hipnozoítos presentes no estágio hepático, sendo a droga de escolha para o tratamento de malária recorrente por *Plasmodium vivax* (RAPHEMOT *et al*, 2016).

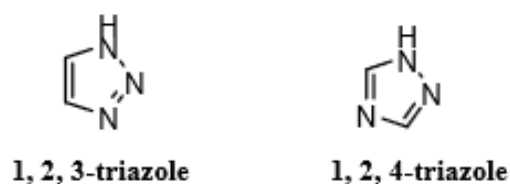
Figura 5. Estrutura química dos antimaláricos derivados de quinolinas



Fonte: Adaptado de SOARES, R. R. 2013

Outras moléculas que são de grande importância no campo da química medicinal são os triazóis e seus derivados, pois estes pertencem a uma classe de compostos excepcionalmente reativos e que possuem muitas propriedades farmacológicas (ASIF, 2014).

O anel triazol (**Figura 6**) consiste em um heterociclo de cinco membros com três átomos de nitrogênio e dois átomos de carbono. Essa estrutura possui aromaticidade e é um sistema rico em elétrons, o que permite que os derivados de triazol reajam facilmente a enzimas e receptores no sistema biológico. Além disso, os derivados de triazol apresentam poucos efeitos adversos, baixa toxicidade, alta biodisponibilidade, boa propriedade farmacocinética, diversidade de administração de medicamentos, e amplo espectro de ação, o que têm colaborado para que se tornem candidatos para o tratamento de diversas doenças (ASIF, 2015). O 1,2,3-triazole é considerado o composto orgânico mais estável quando comparado a outros com três átomos de nitrogênio adjacentes (ASIF, 2014) e é relevante para a química medicinal, pois além de atuar como um grupo farmacofórico, pode ser utilizado como uma conexão entre duas ou mais substâncias de interesse, sendo uma estratégia de hibridação molecular (FREITAS *et al*, 2011).

Figura 6. Estrutura química dos anéis de triazol

Fonte: ASSIF, M. 2014.

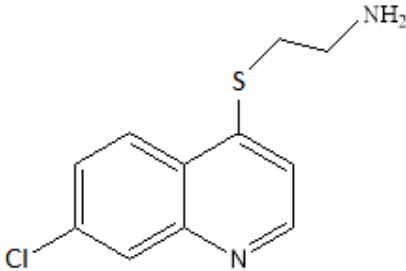
Devido ao crescente número de relatos de resistência aos antimaláricos existentes no mercado, é de extrema importância o estudo de novas moléculas como potenciais antimaláricos. Nesse trabalho 4 compostos derivados de triazóis e um derivado de aminoquinolina tiveram sua atividade antimalárica e citotóxica avaliada *in vitro*.

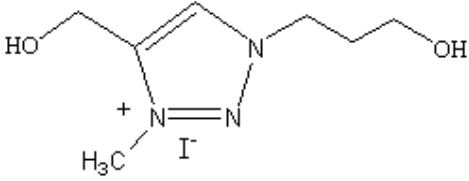
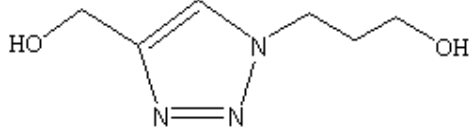
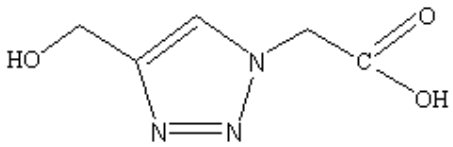
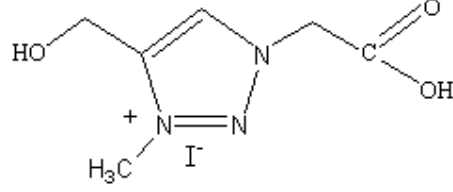
4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Compostos testados

Os compostos testados são derivados de triazóis e de aminoquinolinas e foram sintetizados e disponibilizados pelo grupo do Professor Dr. Adilson David da Silva do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora (**Quadro 1**).

Quadro 1. Estruturas dos compostos testados.

Código	Estrutura
ART59	 <p>The structure shows a quinoline ring system. The benzene ring of the quinoline has a chlorine atom (Cl) at the 3-position. The pyridine ring has a sulfur atom (S) at the 4-position, which is connected to a propyl chain ending in an amino group (NH₂).</p>

ART60	
ART65	
ART66	
ART69	

Os compostos foram solubilizados em água estéril (conforme suas propriedades farmacológicas) a uma concentração de 10mg/mL (solução estoque), no momento do uso nos experimentos de citotoxicidade e antimaláricos. Soluções estoques foram mantidas a 4°C.

Inicialmente foram realizados ensaios quimioterápicos de triagem. Nesse caso, os compostos foram testados nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL.

A seguir, aqueles que demonstraram melhor atividade antiplasmodial foram avaliados também nas concentrações de 1,56 µg/mL, 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL, em cepas 3D7 de *P. falciparum* – cloroquina sensível – e em células HepG2 e HeLa.

4.2.2 Ensaios biológicos

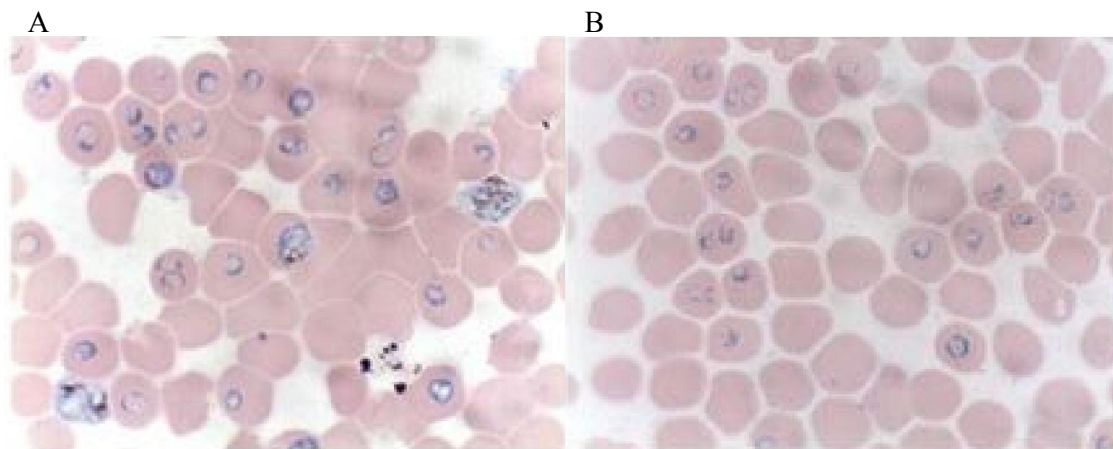
4.2.2.1 Avaliação do potencial antiplasmodial

4.2.2.1.1 Cultivo de rotina

Os experimentos foram realizados em *P. falciparum* cepa 3D7 (cloroquina sensível). A cultura foi mantida em garrafas de 25cm³ a 37°C em atmosfera com baixo teor de oxigênio, contendo meio RPMI 1640 suplementado com glicose 0,11M, Hepes 25mM, Hipoxantina 0,36mM, 1mL de Gentamicina, Bicarbonato de sódio 7,5%, 5% de Albumax (meio completo) e hematócrito de 5% com hemácias humanas do tipo O+. Diariamente foram realizadas a troca do meio RPMI 1640 e a contagem da parasitemia da cultura. Para tal foram confeccionados esfregaços finos, que após secos foram corados com Panótico (Laborclin), e examinados em microscópio óptico com a objetiva de imersão (aumento de 1000X). As parasitemias foram estimadas contando-se o número de hemácias parasitadas em 1000 hemácias contadas.

Para a realização dos ensaios quimioterápicos é necessário que os parasitos se encontrem na forma de trofozoítos jovens (anéis). Para obtenção dessas formas, a cultura contendo 2% de anel ou mais foi sincronizada com o uso de uma solução de sorbitol. Para isso, a cultura foi transferida para um tubo cônico de 50 mL, centrifugada a 900 g por 3 minutos. A seguir, o sobrenadante foi desprezado, sendo adicionados 10 ml de solução de sorbitol 5% estéril ao sedimento de hemácias. Esta mistura foi agitada por inversão durante 10 minutos e incubada a 37°C por mais 10 minutos, seguindo-se centrifugação a 900 g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 10 mL de meio incompleto (meio RPMI 1640 suplementado com glicose 0,11 M, Hepes 25 mM, Hipoxantina 0,36 mM, 1 mL de Gentamicina) para lavar o sedimento de hemácias e nova centrifugação foi realizada. O sobrenadante foi novamente descartado e 10 mL de meio RPMI completo foram adicionados. Para verificar a eficiência do procedimento de sincronismo, uma alíquota do sedimento foi utilizada para a confecção de esfregaços. O sincronismo foi considerado eficiente quando 90% ou mais dos parasitos observados na lâmina estavam em estágio de anel, conforme ilustração abaixo.

Figura 7. Cultura de *P. falciparum* antes (A) e após (B) sincronização



Fonte: Adaptado de RADFAR, A. *et al.* 2009

4.2.2.1.2 Ensaios quimioterápicos

Para o ensaio de atividade antiplasmodial inicial foram utilizadas placas de cultura de 96 poços, onde, em cada poço, foram adicionados 100 μ L de cultura, com parasitemia e hematócrito de 1%, e 100 μ L do composto a ser testado nas concentrações de 25 e 50 μ g/mL. Os testes foram realizados em triplicata. Após 48h de incubação a 37°C em atmosfera de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂, foram confeccionados esfregaços de todos os poços para a contagem da parasitemia ao microscópio óptico.

Além dos compostos testados, foi utilizada a cloroquina, nas mesmas concentrações dos outros compostos, como controle positivo, e poços sem droga, representando o controle de vida, indicando 100% de crescimento dos parasitos. A parasitemia foi então determinada e calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Redução da parasitemia (\%)} = \frac{\text{Parasitemia do composto} \times 100}{\text{Parasitemia controle}}$$

Os compostos que obtiveram os melhores resultados – representados por taxas de redução da parasitemia próximas às taxas obtidas com o controle positivo – foram também testados nas concentrações de 1,56 μ g/mL, 3,125 μ g/mL, 6,25 μ g/mL, 12,5 μ g/mL, 25 μ g/mL e 50 μ g/mL a fim de se determinar a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) do crescimento dos parasitos com o auxílio do programa OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Foram geradas as curvas dose-resposta para os compostos considerados mais ativos contra os parasitos.

4.2.2.2 Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com células HepG2 (hepatocarcinoma humano) e HeLa (câncer cervical humano). Estas foram selecionadas por se tratarem de células imortalizadas, ou seja, capazes de proliferar em cultura e se manter indefinidamente, sendo amplamente utilizadas em pesquisa. As culturas foram mantidas em garrafas de 25 mm³ tratadas para promover adesão celular, contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10% de bicarbonato de sódio e 1% de coquetel antibiótico (10.000UI penicilina, 10 mg estreptomicina, 25 µg anfotericina) (Sigma Aldrich). As culturas foram incubadas a 37°C atmosfera com 5% de CO₂.

A cada 48h o meio de cultura foi substituído sendo o crescimento das células observado em microscópio invertido, no aumento de 200X e 400X. Quando a cultura atingiu 90% de confluência, as células foram tripsinizadas, removidas da garrafa para um tubo cônico de 15 mL contendo meio RPMI completo e centrifugadas a 625 g por 5 minutos. Então o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 1 mL de meio RPMI completo.

O número de células viáveis foi contado na Câmara de Neubauer, no aumento de 200X, utilizando-se o corante azul de Tripán (Sigma-Aldrich) para diferenciação das células vivas e mortas. A partir da contagem das células a solução foi ajustada para 10⁵ células por poço em um volume de 200 µL de meio RPMI 1640 completo.

O potencial citotóxico de cada composto foi estimado por ensaios de citotoxicidade baseados no método do MTT (Mosmann, 1983), um ensaio colorimétrico, quantitativo, que mede a viabilidade das células. Seu mecanismo baseia-se na capacidade que as enzimas desidrogenases mitocondriais têm de reduzir o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-y1)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), solúvel em água e de cor amarela, a um composto denominado formazan, insolúvel em água e de cor azul-púrpura. Esta produção de formazan é proporcional ao número de células viáveis, pois só elas são capazes de reduzir o MTT e inversamente proporcional ao grau de citotoxicidade do composto testado (SENTHILRAJA *et al*, 2015).

Para a realização do ensaio a placa contendo a suspensão celular foi incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ por 24h. Após esse período, o meio foi descartado e foram adicionados 180 µL de meio de cultura completo em cada poço e 20 µL dos compostos testes que obtiveram melhor atividade contra *P. falciparum*, nas concentrações de 1000, 100, 10, 1, 0.1 e 0.01 µg/mL, em triplicata, procedendo incubação por 48h.

A seguir, o meio das placas foi descartado, adicionaram-se 100 µL por poço de solução contendo PBS 1X 5mg/mL MTT (Sigma-Aldrich). Após incubação por 3h, 50µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados em cada poço para solubilizar os cristais de formazan e após 20 minutos realizou-se a leitura das placas em espectrofotômetro a 570nm.

Além dos compostos testados, foi utilizada a cloroquina, como controle positivo, e poços sem droga, representando o controle de vida, indicando 100% de crescimento celular. A citotoxicidade foi determinada em comparação com células cultivadas na ausência de qualquer composto, sendo expressa em porcentagem de viabilidade celular obtida pela razão:

$$\%Viabilidade\ celular = \frac{\textit{leitura\ obtida\ nos\ poços\ expostos\ aos\ compostos}}{\textit{leitura\ dos\ poços\ controle\ sem\ adição\ de\ droga}} \times 100$$

A concentração citotóxica de 50% (CC50) do crescimento das células foi determinada pelo programa OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA), onde foram geradas as curvas dose-resposta para cada composto avaliado. Foram considerados citotóxicos os compostos com concentração citotóxica maior que 50%.

4.2.3 Determinação do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) indica o quanto um composto é seletivo para um parasito, ou seja, quantas vezes o composto é mais ativo no parasito que nas células testadas. Ele auxilia na determinação do potencial de uso que uma droga possui mediante os testes laboratoriais realizados. O IS foi calculado a partir da razão entre o valor de CC₅₀ que o composto apresenta em relação a linhagem celular testada e o valor de IC₅₀ que o composto apresenta em relação ao parasito.

No presente estudo o composto foi considerado promissor se o valor de IS foi maior ou igual a 10 conforme preconizado por Weniger e colaboradores (2001). Sendo assim, drogas com índices de seletividade menores que 10 são consideradas pouco seletivas para o parasito (WENIGER *et al*, 2001).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio quimioterápico de triagem dos compostos, cujos resultados estão expressos no **Quadro 2**, mostrou que as moléculas ART 59 e ART 65 apresentaram maior inibição do crescimento do *P. falciparum* (> 70%), em comparação aos demais compostos analisados, quando testados nas concentrações de 25 e 50 µg/mL. Tais resultados são comparáveis à ação antiplasmodial do composto de referência, a cloroquina, e, portanto, essas

moléculas foram selecionadas para estudos mais detalhados de sua atividade antiplasmodial, com testes em distintas concentrações a fim de determinar suas concentrações inibitórias de 50%. Essas moléculas tiveram ainda, sua citotoxicidade avaliada em duas linhagens celulares.

Quadro 2. Taxa de inibição de crescimento, em porcentagem, de formas sanguíneas de *P. falciparum* dos compostos derivados de aminoquinolinas.

Concentrações teste	% de inibição do crescimento do parasito de acordo com a molécula testada					
	ART 59	ART 60	ART 65	ART 66	ART 69	Cloroquina
25 µg/mL	84	0	86,2	14	11	87
50 µg/mL	79	31	71	55	4	88

A atividade antiplasmodial (IC₅₀) para ART 59 e ART 65, bem como o potencial citotóxico (CC₅₀) de ambas as moléculas foram determinados a partir de sua curva de dose resposta. Os **Gráficos 1 e 2** ilustram o IC₅₀ obtido para ambas as moléculas enquanto no **Quadro 3** encontram-se ilustrados os valores de IC₅₀, CC₅₀ e IS para essas moléculas.

Gráfico 1. Curva dose-resposta de ART 59 contra *P. falciparum* (3d7)

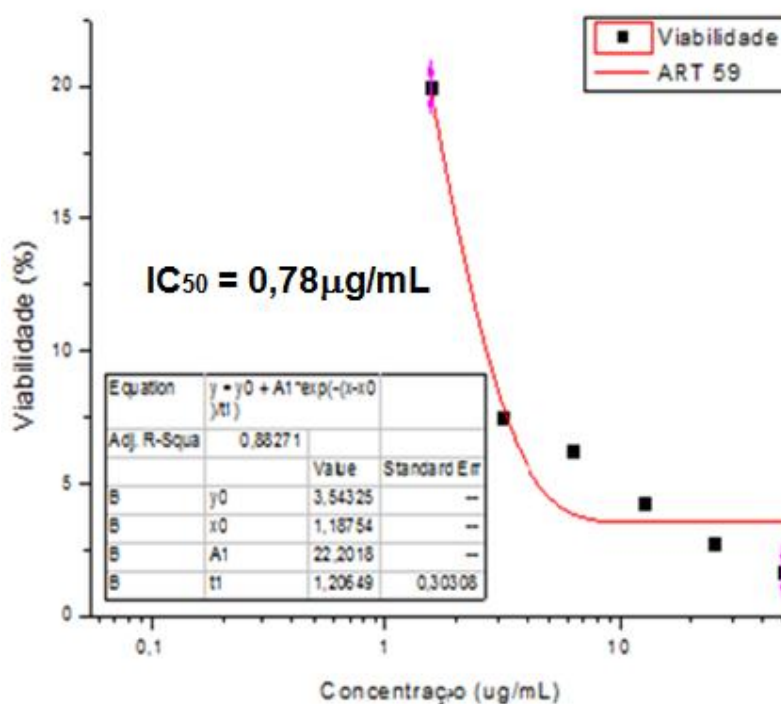
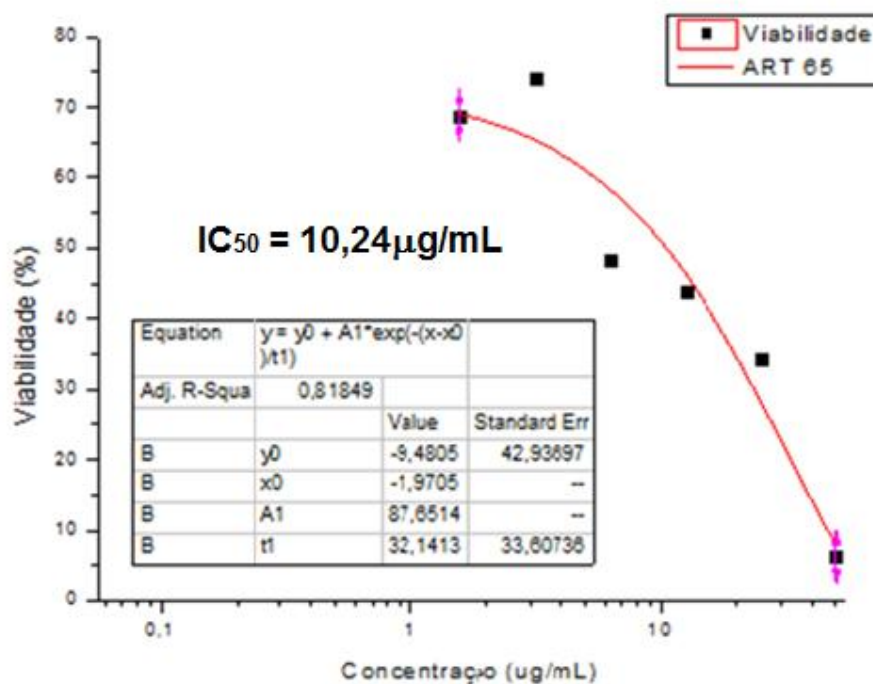


Gráfico 2. Curva dose-resposta de ART 65 contra *P. falciparum* (3d7)



Quadro 3. IC₅₀, CC₅₀ e índice de seletividade dos compostos ART 59 e ART 65

Compostos testados	Parâmetros obtidos				
	IC ₅₀ Pf (3d7)	CC ₅₀ HeLa	CC ₅₀ HepG2	IS HeLa	IS HepG2
ART 59	0,78	25,07	>100	32,14	>128
ART 65	10,24	47,7	>100	4,56	>9,56

Analisando os dados obtidos, é possível perceber que as moléculas apresentam uma boa atividade antimalárica, pois conseguem inibir o crescimento do parasito em baixas concentrações, ou seja, apresentam bons valores de IC₅₀ (IC₅₀-ART59 = 0,78 μg/mL e IC₅₀-ART65 = 10,24 μg/mL). O composto ART 59 se destaca, pois seu valor de IC₅₀ é inferior ao do ART 65.

O composto ART 59 já foi testado contra parasitos do gênero *Leishmania*, onde foi verificado que o composto apresenta forte efeito leishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IC₅₀ de 52,9 μM) e *Leishmania braziliensis* (IC₅₀ de 39,9 μM) e amastigotas de *Leishmania amazonensis* (IC₅₀ de 0,0911 μM) (COIMBRA, E.

S. *et al.* 2016). Isso indica que essa molécula é bastante reativa, como foi verificado nesse estudo contra *P. falciparum* (3d7).

Quanto aos valores de CC_{50} , nenhum dos compostos se mostrou tóxico para nenhuma das linhagens celulares testadas. Em relação à célula HeLa, o composto ART 59 apresentou um $CC_{50} = 25,07 \mu\text{g/mL}$ e o composto ART 65, um $CC_{50} = 47,7 \mu\text{g/mL}$. Em relação à linhagem HepG2, ambas as moléculas apresentaram $CC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$.

Ao analisarmos os valores dos índices de seletividade dessas moléculas, o ART 59 se destaca como melhor composto. Para o índice de seletividade, quanto maior o valor apresentado, mais promissora é a molécula, pois significa que a molécula é mais seletiva ao parasito do que a linhagem celular testada. O composto ART 59 se mostrou bastante seletivo em relação às linhagens testadas ($IS_{\text{HepG2}} > 128$ e $IS_{\text{HeLa}} = 32,14$), principalmente a HepG2, mesmo apresentando certo grau de toxicidade em relação à linhagem HeLa, pois foi ativo contra o parasito em concentrações muito baixas. Já o composto ART 65 se mostrou pouco seletivo, principalmente em relação a HeLa.

É importante ressaltar que em estudos realizados previamente com a molécula ART 59, esta apresentou baixo efeito citotóxico em macrófagos murinos, com CC_{50} próximo de $100,0 \mu\text{M}$ e não foi observada atividade hemolítica em glóbulos vermelhos humanos na concentração máxima testada - $150,0 \mu\text{M}$ (COIMBRA, E. S. *et al.* 2016). Esses dados mostram que o composto ART 59 apresenta uma baixa citotoxicidade em relação a essas células, o que o torna um bom candidato para estudos *in vivo*.

Levando-se em conta estudos anteriores realizados com os compostos derivados de triazóis, é importante esclarecer que existe uma relação direta entre o número de carbonos da cadeia lateral e a citotoxicidade, quanto maior a cadeia, mais citotóxica a molécula. Essa relação foi confirmada observando-se também o coeficiente de partição ($\log P$) dos compostos, quanto mais lipofílicos, mais citotóxicos são os compostos. (GLANZMANN, N. *et al.*). Essas afirmações indicam que, apesar de nem todas as moléculas terem sua citotoxicidade testada nesse trabalho, elas não seriam menos citotóxicas que a ART 65 e que seria interessante reduzir a cadeia lateral da molécula ART 65 para realização de novos testes.

4.4 CONCLUSÃO

Considerando os resultados apresentados é nítido que ART 59 é altamente ativa ao parasito e seletiva em HeLa e HepG2, apresentando baixa toxicidade às células testadas, sendo uma molécula promissora como protótipo de estudo para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos. Já ART 65, apesar de apresentar uma boa atividade antimalárica, é pouco seletiva, o que inviabiliza seu uso como fármaco.

5 CAPÍTULO 2: PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE SYBR GREEN PARA QUIMIOTERAPIA ANTIMALÁRICA IN VITRO

5.1 INTRODUÇÃO

Os testes *in vitro* são realizados com o objetivo de avaliar a sensibilidade dos parasitos a dosagens crescentes de drogas, em comparação com culturas não tratadas. Suas vantagens são a ausência de fatores interferentes relacionados ao hospedeiro, o fato de serem isentos de risco para o paciente e a redução do uso de animais, já que selecionam-se as drogas mais promissoras *in vitro* para posteriores testes *in vivo* (NOGUEIRA *et al*, 2010).

Ao longo dos anos, várias técnicas para testes *in vitro* foram desenvolvidas, como a microscopia, os testes baseados em isótopos e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (TRAORE *et al*, 2015). Em busca de reduzir custos com equipamentos e com mão de obra especializada, foi desenvolvido um método *in vitro* baseado em SYBR Green (SG), um corante de cianina que se liga a ácidos nucleicos, de preferência ao DNA de cadeia dupla, proporcionando assim uma avaliação indireta do número de células em uma população. É altamente fluorescente, quando intercalado em DNA, absorvendo luz a um comprimento de onda entre 390 e 505 nm e emitindo luz a 505-615 nm (DERY *et al*, 2015).

Embora o método do SYBR Green seja considerado validado, ele pode apresentar algumas limitações, como baixa leitura de fluorescência e alto ruído de fundo (DERY *et al*, 2015). Estudiosos demonstraram que o ensaio SYBR Green pode ter sua precisão diminuída em amostras com baixos níveis de parasitemia, o que pode ser resultado da interferência fluorométrica da hemoglobina com o corante SYBR Green I durante a leitura do ensaio. Esses fatores são bem críticos em testes com isolados de campo, pois as densidades do parasito e do número de hemácias variam entre as amostras coletadas de diferentes pacientes (CHERUIYOT *et al*, 2016).

Além das limitações intrínsecas à técnica, alguns fatores externos podem atrapalhar a reprodutibilidade da mesma em diferentes localidades, como variações de temperatura e equipamentos. Portanto, a validação de uma técnica deve ser realizada a fim de se garantir resultados confiáveis e reprodutíveis.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em *P. falciparum* cepa W₂ e o composto selecionado para os testes de padronização foi a cloroquina, por apresentar um IC₅₀ já conhecido, permitindo, assim, comparar os resultados do ensaio com os já definidos pela literatura. A cultura foi mantida em garrafas de 25cm³ a 37°C em atmosfera com 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂, contendo meio RPMI 1640 suplementado com glicose 0,11M, Hepes 25mM, Hipoxantina 0,36mM, 40mg de Gentamicina, 5% de Albumax e hematócrito de 5% com hemácias humanas do tipo O⁺. A troca do meio RPMI 1640 e a contagem da parasitemia da cultura foram realizadas diariamente. A densidade parasitária foi estimada em microscópio óptico com a objetiva de imersão (aumento de 1000x), através de esfregaços finos, fixados com metanol e corados por método de Giemsa.

Para a padronização da técnica, foram utilizados parasitos em fase de anel, obtidos como descrito no item 4.2.2.1.1.

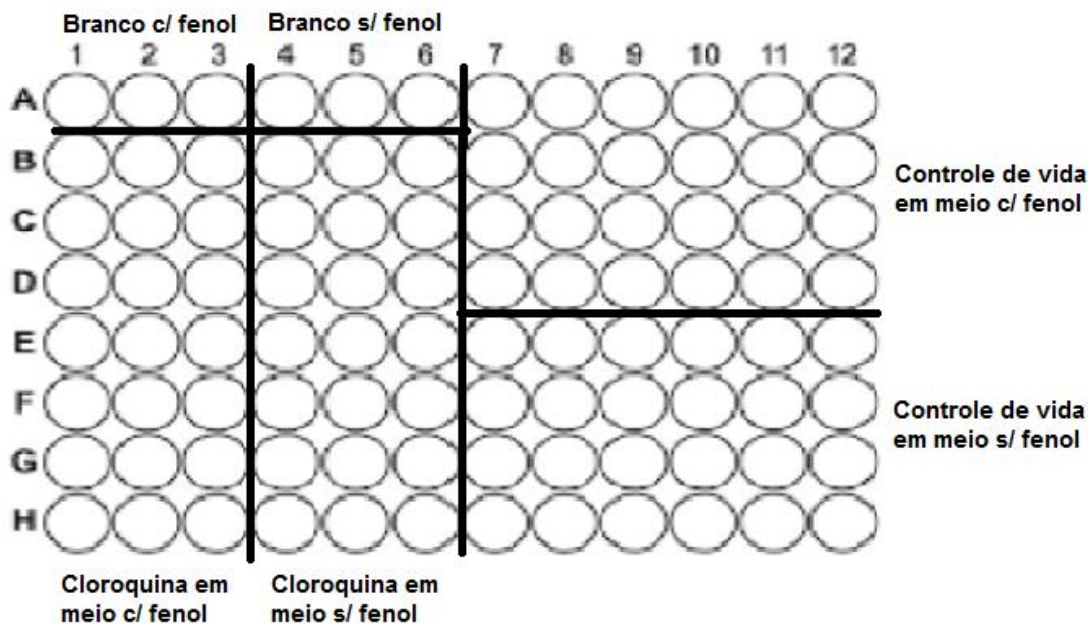
Após o sincronismo da cultura, foi realizada a diluição seriada em placa de 96 poços do composto que seria testado, partindo-se da concentração de 0,78 µg/mL até a concentração final de 0,012 µg/mL. Foram adicionados 100 µL da cultura sincronizada em 100 µL da droga diluída, totalizando um volume de 200 µL de solução por poço.

Os poços de controle de vida continham 100 µL de cultura sincronizada e 100 µL de meio completo, com ou sem fenol, e aos poços de branco, foram colocados 200 µL de meio de cultura, com ou sem fenol.

Foram feitas 4 placas de compostos nas quais diferentes condições de cultivo foram testadas. A primeira teve o hematócrito ajustado para 2% e foi incubada por 48h; na segunda, o hematócrito foi ajustado para 1% e também foi incubada por 48h; a terceira teve o hematócrito ajustado para 2% e foi incubada por 72h; e a última teve hematócrito de 1% sendo incubada por 72h. As placas foram preparadas a partir da cultura que havia sido sincronizada e o hematócrito foi ajustado adicionando-se hemácias O⁺ em solução de meio incompleto 50%.

O desenho esquemático das placas usadas no experimento pode ser visualizado na **Figura 8**.

Figura 8. Desenho esquemático das placas de 96 poços no experimento



Foram testados dois tipos de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) completo, com e sem vermelho de fenol. O vermelho de fenol é uma substância usada como indicador de pH no meio de cultura. Por ser uma substância que confere cor ao meio, o vermelho de fenol poderia causar alguma interferência na leitura, por isso foi considerado uma variável a ser testada.

As placas foram incubadas em estufa a 37°C, em mistura gasogênica contendo 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. Após 48h ou 72h, uma placa com hematócrito final de 2% e uma com hematócrito final de 1% foram retiradas da estufa, sendo confeccionados esfregaços de cada poço de cada concentração da droga bem como dos controles de vida. Então, as placas foram congeladas a -80°C.

Cerca de 24h após o congelamento, as placas foram descongeladas à temperatura ambiente (TA). Então, 100 µL do tampão de lise (20mL de Tris HCl 10mM, 1,86g de EDTA, 800µL de Triton, 80mg de saponina e água deionizada qsp 1000mL) contendo SYBR Green a 0,2µL/mL foram adicionados a cada poço seguindo-se leitura em fluorímetro com excitação em 485nm e emissão em 535nm com ganhos de 100 e de 60.

Os dados foram analisados e a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) do crescimento dos parasitos foi determinada pelo programa OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA), onde foram geradas as curvas dose-resposta para

todas as condições testadas. Então, definiu-se quais as melhores condições para o experimento.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No primeiro ensaio realizado foram analisadas várias variáveis que podem interferir na eficiência do ensaio de SYBR Green: o ganho na leitura das placas (60 ou 100), a fim de alterar a amplitude do sinal; o hematócrito (1 ou 2%); o tempo de incubação (48 ou 72h); a presença de fenol no meio de cultura. Foram feitas as curvas dose-resposta e calculados os valores de IC₅₀ para todas as condições testadas (**Quadro 4**).

Quadro 4. Padronização do ensaio de SYBR Green baseada na atividade antiplasmodial (IC₅₀) da Cloroquina sob diferentes condições de cultivo.

CONDIÇÕES TESTADAS	Hematócrito de 1%				Hematócrito de 2%			
	Ganho de 60		Ganho de 100		Ganho de 60		Ganho de 100	
	RPMI com fenol	RPMI sem fenol	RPMI com fenol	RPMI sem fenol	RPMI com fenol	RPMI sem fenol	RPMI com fenol	RPMI sem fenol
48h de incubação	0,092	0,389	0,091	0,357	0,175	0,125	0,171	0,129
72h de incubação	<0,012	0,025	ND	0,025	0,040	0,048	0,042	0,051

Valores em µg/mL.

Analisando-se os dados obtidos, é possível perceber que não houve interferência do ganho selecionado nos resultados, pois os valores obtidos quando apenas essa variável é alterada não apresentam variação significativa.

Em relação ao hematócrito e tempo de incubação, verificou-se que os valores de IC₅₀ apresentados pelo hematócrito de 1%, com uma incubação de 48h, e pelo hematócrito de 2%, com uma incubação de 72h, se aproximaram mais dos valores de IC₅₀ da cloroquina encontrados na literatura (0,097±0,05 µg/mL), portanto, a repetição do experimento foi realizada para os dois casos citados.

Quanto à influência da presença de fenol no meio, em alguns casos foi observada uma grande diferença nos valores de IC₅₀ e em outros não e, por isso, essa variável também foi reavaliada no segundo experimento.

Após a realização de duas repetições do experimento nas situações selecionadas, foram obtidos os resultados expostos no **Quadro 5**. Alguns valores não foram descritos, pois o coeficiente de regressão linear da curva (R) ficou inferior a 0,7, sendo, portanto, resultados não confiáveis. O coeficiente de regressão linear demonstra quanto os pontos obtidos estão próximos da curva teórica do gráfico, que é a curva ideal, e o objetivo é conseguir um R o mais próximo a 1. Os resultados das triplicatas do experimento foram comparados entre si e também com os valores de IC₅₀ gerados pela análise da microscopia (**Gráficos 3 e 4**).

Quadro 5. Comparação da atividade antiplasmodial (IC₅₀) da Cloroquina em diferentes situações testadas em três repetições.

Condições testadas	Valores de IC ₅₀ encontrados para a cloroquina		
	1º experimento	2º experimento	3º experimento
Hematócrito de 1%, 48h, meio com fenol e ganho de 60	0,092	<0,012	0,045
Hematócrito de 1%, 48h, meio sem fenol e ganho de 60	0,389	-	-
Hematócrito de 2%, 72h, meio com fenol e ganho de 60	0,040	0,023	0,018
Hematócrito de 2%, 72h, meio sem fenol e ganho de 60	0,048	-	<0,012

Valores em µg/mL.

Gráfico 3. Curva dose-resposta de CQ contra *P. falciparum*, utilizando-se RPMI com fenol, hematócrito de 1% e 48h de incubação

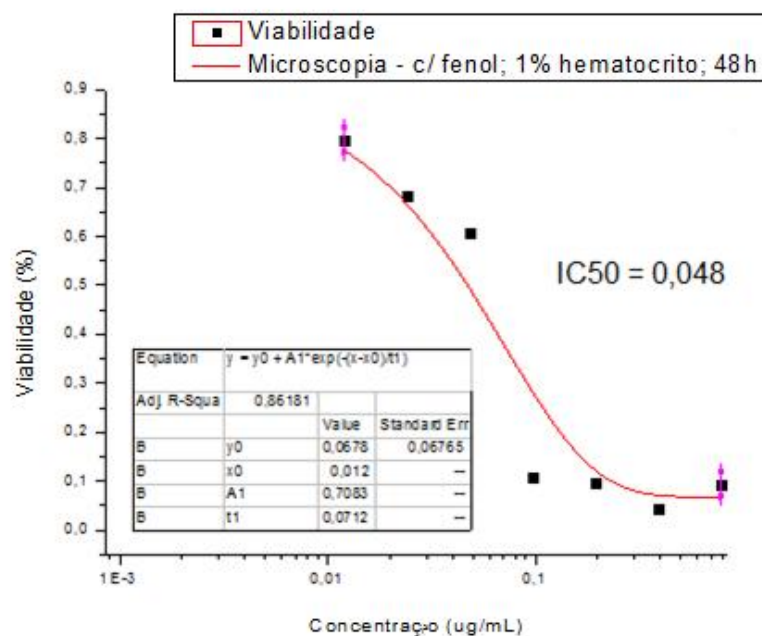
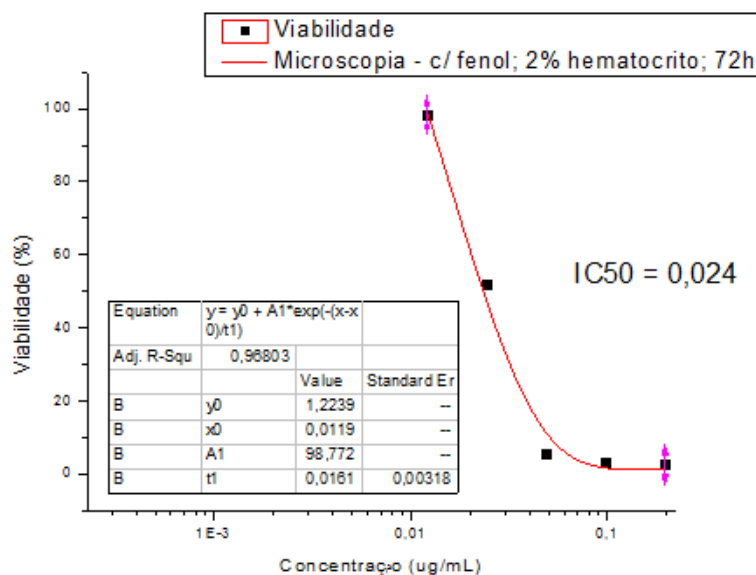


Gráfico 4. Curva dose-resposta de CQ contra *P. falciparum*, utilizando-se RPMI com fenol, hematócrito de 2% e 72h de incubação



Analisando-se os valores obtidos, é possível perceber que a utilização de meio RPMI 1640 sem fenol forneceu resultados que não permitiram gerar curvas de dose-resposta e, quando analisada a microscopia, foi verificado que os controles sem droga atingiram

valores de crescimento inferiores aos controles com meio RPMI 1640 com fenol. Isso indica que a utilização de meio RPMI 1640 com fenol possibilitou um melhor desenvolvimento dos parasitos. Quando comparamos os valores de IC_{50} encontrados na microscopia e nas triplicatas do ensaio de SYBR Green, é perceptível que os valores são comparáveis e, portanto, não há influência da coloração do fenol na leitura do ensaio. Ademais, os valores obtidos com o meio com fenol foram mais próximos ao valor de IC_{50} da cloroquina descrito na literatura.

Quanto à combinação hematócrito e tempo de incubação, observou-se que um hematócrito de 2% com uma incubação de 72h geraram melhores curvas dose-resposta (**Gráficos 5, 6 e 7**), com $R > 0,9$, e as três repetições apresentaram valores considerados próximos e comparáveis ao valor encontrado na microscopia ($IC_{50} = 0,024 \mu\text{g/mL}$).

Gráfico 5. Curva dose-resposta de CQ contra *P. falciparum*, utilizando-se RPMI com fenol, hematócrito de 2%, 72h de incubação e ganho de 60 na leitura, no primeiro experimento.

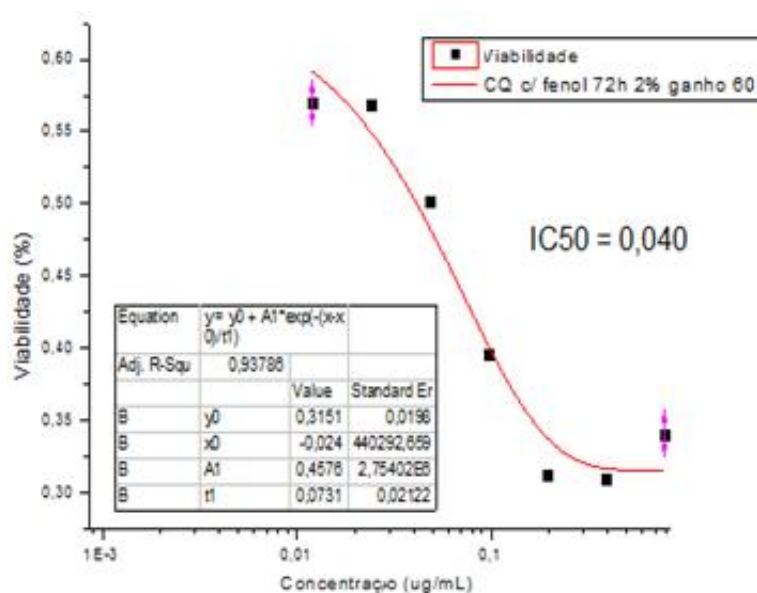


Gráfico 6. Curva dose-resposta de CQ contra *P. falciparum*, utilizando-se RPMI com fenol, hematócrito de 2%, 72h de incubação e ganho de 60 na leitura, no segundo experimento.

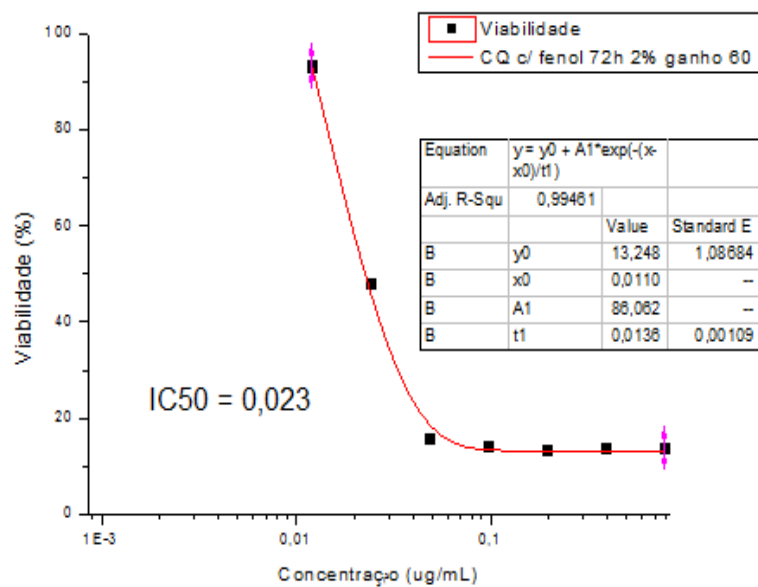
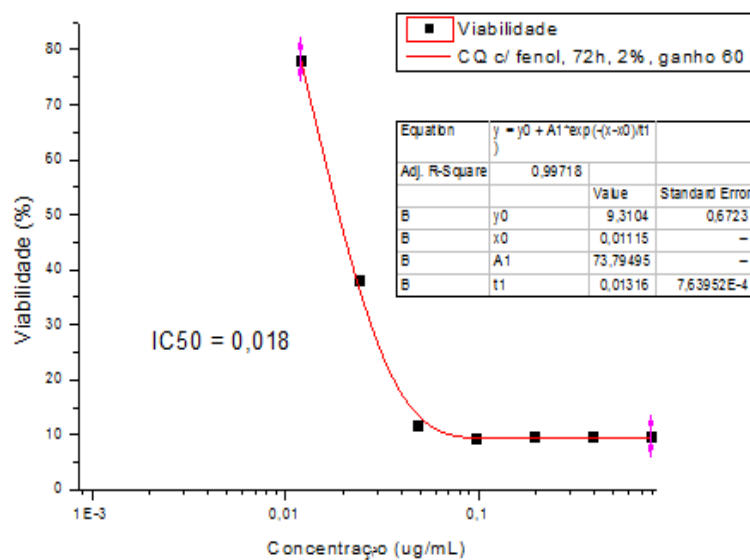


Gráfico 7. Curva dose-resposta de CQ contra *P. falciparum*, utilizando-se RPMI com fenol, hematócrito de 2%, 72h de incubação e ganho de 60 na leitura, no terceiro experimento.



5.4 CONCLUSÕES

Ao analisarem-se os dados obtidos nas triplicatas do experimento e compará-las aos dados obtidos pela leitura microscópica, verificou-se que as melhores condições para realização do ensaio de SYBR Green envolve o uso de um hematócrito de 2%, incubação de 72h, meio com fenol e um ganho de 60 na leitura.

REFERÊNCIAS

ABBA, K. *et al.* Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries. **Cochrane Database of Systematic Reviews** 6 (7): CD008122. Doi: 10.1002/14651858.CD008122.pub2.

ANTINORI, S. GALIMBERT, L. MILAZZO, L. CORBELLINO, M. Biology of Human Malaria Plasmodia Including Plasmodium knowlesi. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, 4(1): e2012013, 2012.

ASIF, M. A Mini Review on Antimalarial Activities of Biologically Active Substituted Triazoles Derivatives. **International Journal of Advanced Research in Chemical Science**, v. 1, p. 22-28, 2014.

ASIF, M. Antiviral and antiparasitic activities of various substituted triazole derivatives: A mini review. **Chemistry International** p. 71-80, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil / Ministério da Saúde, **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília**, 2010.

CALLAGHAM, P. S. SIRIWARDANA, A. HASSETT, M. R. ROEPE, P. D. *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (PfCRT) isoforms PH1 and PH2 perturb vacuolar physiology. **Malaria Journal**, 15:186, 2016.

CERQUEIRA, G. C. *et al.* Longitudinal genomic surveillance of *Plasmodium falciparum* malaria parasites reveals complex genomic architecture of emerging artemisinin resistance. **Genome Biology**, 18:78, 2017.

CHERUIYOT, A. C. *et al.* Assessment of the Worldwide Antimalarial Resistance Network Standardized Procedure for In Vitro Malaria Drug Sensitivity Testing Using SYBR Green Assay for Field Samples with Various Initial Parasitemia Levels. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v60, n4, 2016.

COIMBRA, E. S. *et al.* Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. **Chemico-Biological Interactions**, v. 260, p. 50-57, 2016.

CUI, L. *et al.* Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 93(Suppl 3), pp. 57–68, 2015.

DERY, V. *et al.* An improved SYBR Green-1-based fluorescence method for the routine monitoring of *Plasmodium falciparum* resistance to anti-malarial drugs. **Malaria Journal**, 14:481, 2015.

DESHPANDE, S. KUPPAST, B.4-aminoquinolines: An Overview of Antimalarial Chemotherapy. **Med Chem** 6: 001-011, 2016

FERREIRA, M. U. CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination on Brazil. **Malaria Journal**, 15:284, 2016.

FREITAS, L. B. O. et al. A reação "click" na síntese de 1,2,3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. **Química Nova**, v. 34, n. 10, 2011.

GLANZMANN, N. et al. Synthesis, Characterization and NMR Studies of 1,2,3-triazolium Ionic Liquids: A Good Perspective Regarding Cytotoxicity. **Template for Submission of Manuscripts to the Journal of the Brazilian Chemical Society**.

GOMES, A. P. et al. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, 2011.

GOMES, P. R. et al. Síntese e Avaliação da Atividade Antimalárica de Compostos Derivados da Curcumina. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 492-496, 2014.

GREENWOOD, B. M. et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of clinical investigation**, 118(4), 1266-1276, 2008.

JUGE, N. et al. Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter is a H⁺-coupled polyspecific nutrient and drug exporter. **PNAS**, v. 112, n. 11, 2015.

MANZOOR, H. M. et al. Recent developments of quinoline based antimalarial agents. **Afinidad**, v. 74, n. 579, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da Saúde: Ações do Programa de Malária, 2014. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria/acoes-do-programa-de-malaria>. Acesso em: 09/01/2018.

MISHRA, N. et al. Surveillance of Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum in India Using the kelch13 Molecular Marker. **Antimicrobial agents e chemotherapy**, v. 59, n. 5, 2015.

MONTEIRO, M. R. C. C. FERNANDES, S. C. RIBEIRO, M.C. Aspectos clínicos e epidemiológicos da malária em um hospital universitário de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazonica Saude**, 4(2):33-43, 2013.

NOGUEIRA F, et al. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. **Rev Pan-Amazonica Saude**, 1(3):109-124, 2010.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. LACERDA, M. G. V. BRASIL, P. LADISLAU, J. L. B. TAUIL, P. L. DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, 9:115, 2010.

OSÓRIO-DE-CASTRO, C.G.S. et al. Conhecimentos, práticas e percepções de profissionais de saúde sobre o tratamento de malária não complicada em municípios de alto risco da Amazônia Legal. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, Supl. 1, p. 1445-1456, 2011.

PETERSEN, I. Balancing drug resistance and growth rates via compensatory mutations in the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter. **Molecular microbiology**, v. 97 p. 381-195, 2015.

PRADINES, B. *et al.* La résistance aux antipaludiques. **Revue Francophone des Laboratoires**, n. 422, 2010.

RADFAR, A. *et al.* Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. **Nature protocols**, v. 4 p. 1899-1915, 2009.

RAPHEMOT, R. POSFAI, D. DERBYSHIRE, E. R. Current therapies and future possibilities for drug development against liver-stage. **The Journal of Clinical Investigation**, v126, n. 6, 2016.

RECHT, J. *et al.* Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. **Malaria Journal**, 2017.

SENTHILRAJA, P. K. KATHIRESAN, K. In vitro cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF -7 cell lines study of Marine Yeast. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, p. 080-084, 2015.

SOARES, R. R. Avaliação da atividade antimalárica de análogos de 4-aminoquinolinas e 6-mercaptopurinas em modelo murino. **Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas da UFJF**, Juiz de Fora, 2013.

SOULARD, V. *et al.* *Plasmodium falciparum* full life cycle and *Plasmodium ovale* liver stages in humanized mice. **Nature Communications**, v. 6. n. 7690, 2015.

SOUZA, N. B. Antimaláricos a partir de moléculas obtidas por síntese como análogos de cloroquina e compostos naftoquinoidais. **Tese de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou**, Belo Horizonte, 2015.

SOUZA, N. B. *et al.* 4-aminoquinoline analogues and its platinum (II) complexes as antimalarial agents. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, p. 313-316, 2011

TRAORE, K. *et al.* Drying anti-malarial drugs *in vitro* tests to outsource SYBR green assays. **Malaria Journal**, 14:90, 2015.

WEELS, T. N. C. ALONSO, P. L. GUTTERIDGE, W. E. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. **Nature Reviews Drug Discovery**, 8: 879-891.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGO, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, G.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 193–200, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - Global technical strategy for malaria 2016–2030. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2015a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - Guidelines for the treatment of malaria. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2015b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Responding to antimalarial drug resistance, 2017a. Disponível em: http://www.who.int/malaria/areas/drug_resistance/overview/en/ Acesso em: 10/01/2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World malaria report 2016. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World malaria report 2017. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2017b.

YEO, S. J. Liu, D. X. KIM, H. S. PARK, H. Anti-malarial effect of novel chloroquine derivatives as agents for the treatment of malaria. **Malaria Journal**, 16:80, 2017.