

INTRODUÇÃO

Produtos naturais possuem um importante papel no desenvolvimento de fármacos e no tratamento de doenças. Nesse contexto, plantas da família Amaryllidaceae se mostram uma fonte de compostos com diversas atividades, como é o caso dos alcaloides¹. Licorina é um dos alcaloides mais encontrados em plantas dessa família e já possui diversas atividades citadas na literatura, como antitumoral, anti-inflamatória, antifúngica e diversas outras². Estudos anteriores do grupo de pesquisa também mostraram uma atividade tricomonocida desse alcaloide. A infecção causada por *Trichomonas vaginalis*, tricomoníase, representa um grande problema de saúde pública, devido ao aumento da resistência dos isolados ao tratamento de escolha e às sérias complicações que pode acarretar. Assim, é necessário buscar novos fármacos e novos alvos terapêuticos. Por isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os mecanismos envolvidos nessa atividade anti-*Trichomonas vaginalis* do alcaloide licorina, bem como a toxicidade desse composto *in vivo*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo dos isolados

Para este estudo foram utilizados dois isolados *American Type Culture Collection* (ATCC), *T. vaginalis* 30236. As culturas foram mantidas em meio trypticase-extrato de levedo-maltose (TYM) em pH 6,0, suplementado com 10% de soro bovino estéril e inativado a 37 °C.

Determinação da IC₅₀

Uma suspensão de trofozoito na concentração de 2,0 x 10⁵ trofozoítos/mL foi incubada com concentrações decrescentes do composto, partindo de 100 µM a 37 °C, 5% de atmosfera de CO₂ durante 24 h. Para determinar o número de trofozoítos viáveis foi utilizado hemocitômetro e o corante de exclusão Trypan Blue (0,2%).

Hemólise

Eritrócitos humanos foram obtidos de sangue de voluntários saudáveis. As amostras foram lavadas três vezes com PBS 1x (pH 7,0) e re-suspensas para obter uma suspensão eritrocítica 1,0% (v/v). Em seguida, os eritrócitos (1,0%) foram incubados com o composto na IC₅₀ a 37 °C durante 1 h e 24 h, o sobrenadante foi medido espectrofotometricamente a 540 nm.

Citotoxicidade

Células da linhagem HMVII, cultivadas em meio RPMI, incubadas a 37°C e 5% de CO₂. As células foram então colocadas em contato com o alcaloide em um gradiente de concentração. Como controle positivo, foi utilizado Triton X-100 a 0,2%, e como controle do veículo foi utilizado água estéril pH 6. As placas foram incubadas durante 24 e 48h. Após este período, foi determinada a viabilidade das células pelo ensaio do MTT.

RESULTADOS

No ensaio para determinação do IC₅₀ obteve-se um valor de 38 µM. Assim, nos experimentos seguintes trabalhou-se com esse valor e, por vezes, com a concentração de 100 µM.

Após os ensaios que avaliam o efeito do composto nos isolados, foram realizados experimentos para determinar a toxicidade do composto frente às células sanguíneas, células epiteliais *in vitro* e a um modelo *in vivo*. A avaliação da hemólise demonstrou que licorina testada em ambas concentrações apresentou uma taxa inferior a 15%, quando comparada com um controle positivo (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade hemolítica da licorina na concentração de 38 µM. Resultados expressos em porcentagem de lise de eritrócitos comparados com um controle positivo (Triton X-100 0,2%).

	Hemólise (%)	
	1h	24h
Controle	100,00	100,00
Licorina (38 µM)	5,51 ± 0,07	7,77 ± 0,51

O ensaio *in vitro* de citotoxicidade utilizando células epiteliais vaginais da linhagem HMVII demonstrou que a licorina foi citotóxica, o que já era esperado visto que são células de linhagem tumoral (Tabela 2). Porém quando testado no modelo *in vivo* de *G. mellonella* não apresentou toxicidade (Tabela 3). Desta forma, o composto pode ser considerado promissor.

Tabela 2. Valores de IC₅₀ e CC₅₀ obtidos após os ensaios, através de software GraphPad Prism 6. A partir desses dois valores, obteve-se o índice de seletividade, que é a razão entre o CC₅₀ e o IC₅₀.

IC ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM)	IS (µM)
38	3,5	0,091

Tabela 3. Efeito da toxicidade do composto sobre larvas de *Galleria mellonella* em três concentrações diferentes: 1, 10 e 50 mg/Kg de larva. Como controle de injeção foi utilizada água. Para controle de morte, utilizou-se DMSO.

Condições	Viabilidade (%)
Controle	100 ± 0
H ₂ O	100 ± 0
DMSO	0,00 ± 0
50 mg/Kg	98,66 ± 0,23
10 mg/Kg	100 ± 0
1 mg/Kg	93,33 ± 0,57

CONCLUSÕES

A tricomoníase representa um importante problema de saúde pública, por isso fica evidente a importância de buscar novas moléculas com atividade tricomonocida, bem como novos alvos terapêuticos. Neste estudo foi demonstrado:

1. Atividade anti-*T. vaginalis* do alcaloide licorina com IC₅₀ igual a 38 µM;
2. Licorina não é hemolítica e apresenta efeito citotóxico contra a linhagem tumoral HMVII;
3. Licorina não apresentou toxicidade no modelo *in vivo* de *G. mellonella*;
4. Licorina não aumenta a liberação de EROs pelos parasitos, o que demonstra um mecanismo diferente ao dos fármacos de escolha, metronidazol e tinidazol;
5. Quando tratados com licorina, os trofozoítos aumentam a produção de EROs pelos neutrófilos, sugerindo um mecanismo adjuvante no tratamento através da resposta imune.

Toxicidade em *Galleria mellonella*

Para avaliar a toxicidade do composto em um modelo *in vivo*, foi realizada a injeção do composto em larvas de *Galleria Mellonella*. Foram preparadas três concentrações de amostra (50 mg/Kg, 10 mg/Kg e 1 mg/kg) calculadas a partir de um peso médio de larva de 280mg. Foram utilizadas 10 larvas para cada condição e foi realizado controle de injeção e de veículo. Todas as condições foram observadas por 120h, avaliadas quanto a presença de motilidade através de estímulos físicos e comparadas com um controle onde não houve administração de nenhuma solução.

Produção de EROs por tricomonas expostas à Licorina

Trofozoítos (5x10⁶ trof/mL) foram incubados com 10 µM de diacetato de diclorofluoresceína (2', 7'-DCF-DA) por 1h a 37 °C. Passado este tempo, o composto na IC₅₀ e em 100 µM foi adicionado e incubado por mais 1h. Como controle positivo, utilizou-se peróxido de hidrogênio (5,0 mM). A fluorescência foi medida por citometria de fluxo (BD FACSVerse™, Becton 45 Dickinson) e 10,000 células foram analisadas pelo software BD FACSuite™

Produção de EROs por neutrófilos

A fim de avaliar se o alcaloide influencia de alguma forma na liberação de EROs por neutrófilos humanos, realizou-se um processo semelhante ao anterior. Porém, nessa etapa, neutrófilos foram isolados e coincubados com tricomonas tratados e não tratados com licorina, e incubados apenas com o composto.

Avaliou-se também o efeito da licorina na liberação de EROs por *T. vaginalis* e por células da resposta imune inata, os neutrófilos. Licorina não produz efeito na liberação de EROs nos trofozoítos. Em contraste, foi possível observar que o composto aumentou a produção de EROs por neutrófilos, quando os mesmos foram coincubados com trofozoítos previamente tratados com licorina, sugerindo um efeito adjuvante do alcaloide na resposta imune frente ao parasito.

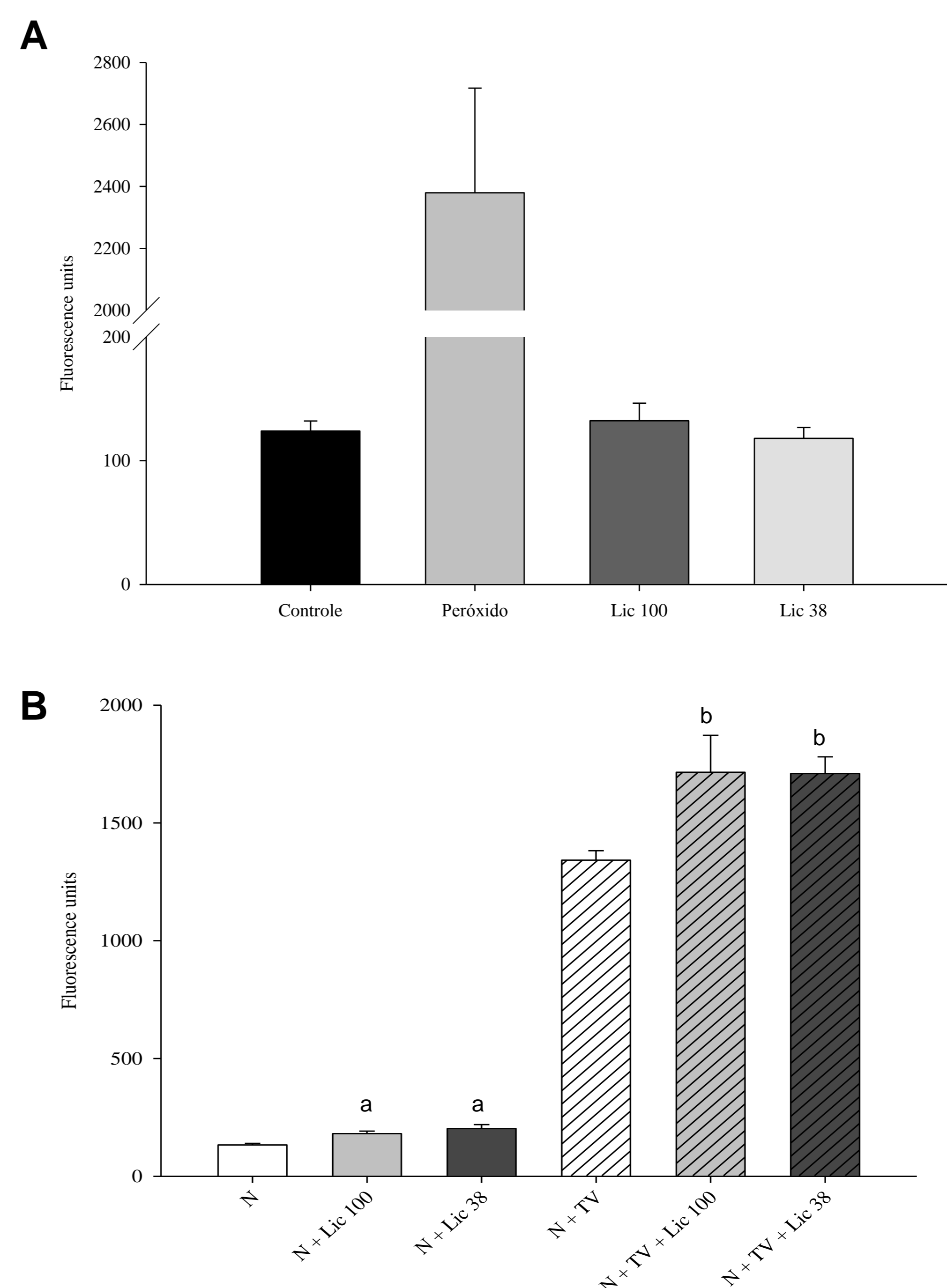


Figura 4. No gráfico (A), está representada a produção de EROs por trofozoítos de *T. vaginalis* tratados com licorina na IC₅₀ e em 100 µM. Foi utilizado peróxido de hidrogênio na concentração de 5,0 mM como controle positivo para produção de EROs. As barras representam o desvio padrão das médias de três experimentos independentes.

Já o gráfico (B) representa a produção de EROs por neutrófilos quando incubados com *Trichomonas vaginalis* (N + TV), quando incubados com trofozoítos tratados com licorina (N + TV + Lic 100 ou 38) e apenas na presença do composto (N + Lic 100 ou 38). a. redução significativa b. aumento significativo (p>0,05). Neutrófilos tratados com peróxido de hidrogênio (5,0 mM) apresentaram 3154,2 ± 445,3 unidades de fluorescência.

REFERÊNCIAS

- ¹Unver, N., 2017. Phytochemistry. Rev. 6; 125–135
- ²Giordani, RB. et al., 2011. Phytochemistry. Vol. 72; 645–650
- ³Menezes, CB. et al., 2016. Microbial Cell. Vol. 3 No.. 9; 404–418

AGRADECIMENTOS

