

PLANO DE TRABALHO E RELATÓRIO DE ATIVIDADES PARA ALUNO PESQUISADOR INICIANTE (API)

TÍTULO DO PLANO (200): Relatório de atividades: Investigação da atividade anti-T. vaginalis de frações de própolis marrom
VINCULADO AO PROJETO DE PESQUISA (200): 24940: Investigação da atividade citotóxica de produtos naturais e sintéticos contra protozoários patogênicos amitocndriados
ORIENTADOR (100): Tiana Tasca
ALUNO PESQUISADOR INICIANTE (se houver)(100): Micheli Ferla
PERÍODO INTEGRAL DAS ATIVIDADES: de 25/ 07/2018 a de 21/ 02/2019
RESUMO (1600): A tricomoníase humana, causada pelo <i>Trichomonas vaginalis</i> , é a DST não viral mais comum no mundo. O tratamento é realizado através de uma única classe de fármacos e apresenta falhas como não adesão do paciente e resistência. Neste contexto, é importante direcionar a prospecção, síntese e avaliação biológica de moléculas de interesse farmacêutico com vistas à atividade antiprotozoária, em especial, anti-T. vaginalis. A tricomoníase pode originar graves sequelas como facilitação da aquisição do vírus HIV pelo T. vaginalis, problemas na gestação, infertilidade e câncer cervical e de próstata. Mundialmente o desenvolvimento e a descoberta de novas terapias farmacológicas para doenças parasitárias têm sido alvos de vários pesquisadores, direcionando-os a um vasto conjunto de novas moléculas e ações interligadas para a investigação da atividade terapêutica.

ATIVIDADE 01	ENTRE (mês/ano): 07/2018 a 02/2019
TÍTULO (200): <i>Cultivo in vitro dos protozoários</i>	
DESCRIÇÃO (1000): 1. <i>Trichomonas vaginalis</i> : neste estudo serão utilizados isolados padrões da American Type Culture Collection (ATCC) e isolados clínicos frescos de T. vaginalis provenientes do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS (projeto 18923 aprovado pelo CEP/UFRGS). Os isolados serão cultivados no meio trypticase-extrato de levedo-maltose (TYM) (Diamond, 1957), pH 6,0 suplementado com 10% de soro bovino estéril e inativado. A incubação será realizada a 37°C.	
RELATÓRIO DA ATIVIDADE (1000): Neste estudo trabalhou-se com o isolado 30236 proveniente da American Type Culture Collection (ATCC), a atividade de cultivo em meio tripticase-extrato de levedo-maltose (TYM), pH 6,0, suplementado com antimicrobiano e 10% de soro bovino inativado, sendo as culturas mantidas em 37°C por 24h. Os organismos que obtiveram crescimento satisfatório em 24h mantendo a motilidade e morfologia característica do protozoário foram utilizados em experimentos.	

ATIVIDADE 02	ENTRE (mês/ano): 07/2018 a 09/2018
TÍTULO (200): <i>Ensaio da atividade antiprotozoária - screening</i>	
DESCRIÇÃO (1000): Os testes para investigar a atividade anti-T. vaginalis serão realizados através da incubação dos parasitos com as amostras utilizando microplaca de 96 poços onde serão adicionados em cada poço 50 µL das soluções das amostras a serem testadas na concentração final de 1,0 mg/mL. Após, 150 µL de uma suspensão contendo 1,0x10 ⁵ trofozoítos/mL serão adicionados em cada poço já contendo meio e a amostra devidamente diluída. As microplacas serão mantidas por 48 horas em anaerobiose a 37°C. Após esse período, as microplacas serão visualizadas em microscópio invertido para observação da viabilidade dos trofozoítos. No poço onde não forem observados organismos vivos e móveis o efeito citotóxico será confirmado pela exclusão com trypan blue (0,2%).	
RELATÓRIO DA ATIVIDADE (1000): Esta atividade já havia sido realizada com várias frações da própolis marrom. As frações acetato de etila e acetato de etila com diclorometano apresentaram atividade e deram continuidade ao estudo.	

ATIVIDADE 03	ENTRE (mês/ano): 08/2018 a 12/2018
TÍTULO (200): <i>Ensaio da atividade antiprotozoária - determinação da concentração inibitória mínima (MIC, do inglês minimum inhibitory concentration) ou IC50 (concentração necessária para inibir 50% da viabilidade)</i>	
DESCRIÇÃO (1000): As amostras que apresentarem atividade antiprotozoária no screening serão testadas para determinação da MIC ou IC50. O ensaio é o mesmo descrito anteriormente para o	

screening, porém com diluição seriada e o conteúdo do poço considerado 100% de parasitos mortos na microscopia será inoculado em meio de cultura e analisado a cada 24h até 120 h para MIC e o valor de IC50 será calculado através do software GraphPad Prism6 pelo modelo de regressão não linear.	
RELATÓRIO DA ATIVIDADE (1000): As frações da própolis marrom utilizadas neste estudo são provenientes de parceria com o grupo de pesquisa da UFMS. Elas foram solubilizadas em DMSO, obtendo uma concentração de 500ug/mL. Em uma placa de 96 poços, foi realizada a diluição seriada, utilizando o isolado 30236 (ATCC) na densidade de 2×10^5 trofozoítos/mL. A incubação se deu por 24h, em 37°C e 5% de CO ₂ . Após este tempo, houve a contagem de todos os poços da placa, utilizando o corante de exclusão Trypan blue (0,2%). E o conteúdo do poço considerado 100% de parasitos mortos foi inoculado em meio de cultura e analisado a cada 24h até 120 h para MIC e o valor de IC50 que foi calculado através do software GraphPad Prism6 pelo modelo de regressão não linear. As concentrações de ambas as frações revelaram potencial atividade anti-T. vaginalis com valores MIC e IC50 de 500 e 83 µg/mL para a fração acetato de etila, assim como 500 e 168 µg/mL para a fração acetato de etila com diclorometano, respectivamente.	

ATIVIDADE 04	ENTRE (mês/ano): 08/2018 a 10/2018
TÍTULO (200): <i>Efeito das amostras ativas na cinética de crescimento dos parasitos</i>	
DESCRIÇÃO (1000): As amostras que apresentarem atividade antiprotozoária serão acrescentadas ao meio de cultura para investigar o efeito no crescimento in vitro dos parasitos. O inóculo inicial será 1×10^5 trofozoítos/mL e serão realizadas contagens dos trofozoítos em hemocitômetro a cada 24 horas. O experimento será realizado em triplicata, com resultados similares obtidos em, no mínimo, três diferentes culturas de trofozoítos.	
RELATÓRIO DA ATIVIDADE (1000): O estudo para avaliar o efeito das frações na cinética de crescimento foi feito utilizando o isolado 30236 proveniente da American Type Culture Collection (ATCC) na densidade de 2×10^5 trofozoítos/mL, foi incubado nos valores da MIC de ambas as frações. A contagem de trofozoítos viáveis foi feita em 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 h. Parasitos em meio TYM foram utilizado como controle negativo e em DMSO 0,6% como controle do veículo, ambos foram encubados e submetidos as mesmas avaliações. Os resultados foram expressos em trofozoítos/mL, comparando os tratados via trofozoítos viáveis com parasitas não tratados. Os parasitas tratados com fração apresentaram uma redução significativa no crescimento em 6 horas para a fração acetato de etila e em 4 horas para a fração acetato de etila com diclorometano. O crescimento de tricomonas foi suprimido pelas duas frações após 24 horas de incubação.	

ATIVIDADE 05	ENTRE (mês/ano): 11/2018 a 02/2019
TÍTULO (200): <i>Citotoxicidade contra células mamíferas</i>	
DESCRIÇÃO (1000): Diferentes linhagens celulares serão utilizadas para o teste de citotoxicidade: células epiteliais vaginais humanas derivadas de melanoma (HMOVII) e fibroblastos (3T3-C1). As células serão cultivadas em meio RPMI ou DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) a 37 °C e 5% CO ₂ . Para o teste de citotoxicidade, $1,5 \times 10^4$ células por poço serão semeados em microplacas de 96 poços por 24 horas. Após este período, o meio será substituído com meio fresco contend ou não (condição controle) as amostras na CIM. Uma solução de triton X-100 a 1,0% será utilizada como controle positivo. As placas serão incubadas por 24 horas, e então, após uma lavagem com PBS, uma solução de MTT a 0,5 mg/mL será adicionada aos poços e incubada a temperatura ambiente por 1 hora. As placas serão lavadas duas vezes com PBS, e o produto púrpura insolúvel formazan será dissolvido DMSO. A quantidade de MTT reduzido será determinada através de leitura em 570nm.	
RELATÓRIO DA ATIVIDADE (1000): Para avaliar a citotoxicidade das frações, as células das linhagens HMOVII e VERO foram utilizadas. A fração acetato de etila mostrou baixa citotoxicidade tanto para VERO quanto para HMOVII, com valores de SI 3,14 e 2,69, respectivamente. A fração acetato de etila com diclorometano apresentou valores de IS (índice de seletividade) 2,01 para VERO e 1,48 para células HMOVII.	

ATIVIDADE 06	ENTRE (mês/ano): 11/2018 a 02/2019
---------------------	------------------------------------

TÍTULO (200): <i>Efeito das amostras ativas no ensaio de hemólise</i>
DESCRIÇÃO (1000): A taxa de hemólise foi realizada como descrito por Kiss et. al., com algumas modificações. O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul aprovou documentos, procedimentos e projetos sob autorização CAAE 47423415.5.0000.5347. Os eritrócitos foram obtidos a partir do sangue heparinizado de doadores humanos saudáveis. Foram lavados três vezes com PBS 1x (pH 7,0; 37°C) a 3000 RPM durante 5 minutos e ressuspensos para obter um $5,0 \times 10^7$ células/mL. Em seguida, as suspensões de eritrócitos foram incubadas com oito diluições seriadas de cada fração por 24 h a 37 °C. Depois, a hemoglobina libertada foi medida a 540 nm. Dois controles foram preparados: controle negativo (eritrócitos e PBS 1x) e controle positivo (eritrócitos e Triton X-100 0,2%). Os resultados foram expressos como a percentagem de hemólise de cada composto, comparando com a hemólise a 100% que foi atribuída à ação hemolítica do controle positivo Triton X-100 a 0,2%.
RELATÓRIO DA ATIVIDADE (1000): O ensaio de hemólise demonstra a compatibilidade de compostos contra eritrócitos. Os valores de HC50 de 224 µg/mL e 150 µg/mL para as frações acetato de etila e acetato de etila e diclorometano, respectivamente. Os valores de IS (índice de seletividade) foram determinados como 2,70 e 0,89 para as frações acetato de etila e acetato de etila com diclorometano, respectivamente.

CONCLUSÕES (1000): Estes resultados indicam que as frações de própolis apresentam promissora atividade anti-T. vaginalis; estudos sobre a elucidação química do composto bioativo e mecanismo de ação estão em andamento.
RESULTADOS (1000): A tabela 1 mostra os resultados de MIC e IC50, citotoxicidade e hemólise das duas frações testadas. Já a figura 1 mostra os resultados da cinética de crescimento.

Espaço opcional a ser usado por ocasião da elaboração do **PLANO DE TRABALHO**.

Inserir neste espaço **AQUI** abaixo **MATERIAL COMPLEMENTAR** relacionado ao **PLANO DE TRABALHO**.

(é possível inserir imagens, textos, tabelas, etc.) Fazer referência às inserções no texto inserido acima.



Espaço opcional a ser usado por ocasião da elaboração do **RELATÓRIO (ao final do período atividade de pesquisa)**. Inserir neste espaço **AQUI** abaixo **MATERIAL COMPLEMENTAR** relacionado ao **RELATÓRIO**.

(é possível inserir imagens, textos, tabelas, etc.) Fazer referência às inserções no texto inserido acima.

Resultados dos experimentos citados:

Table 1: Anti-*Trichomonas vaginalis* activity, cytotoxicity against VERO and HMOVII lineages and hemolysis of fractions from Brazilian brown propolis.

Fraction		P-Ac	P-Ac-DCM
ATCC30236	MIC	500 µg/mL	500 µg/mL
	IC ₅₀	83 µg/mL	168 µg/mL
HMOVII	CC ₅₀	224 µg/mL	250 µg/mL
	SI	2.69	1.48
VERO	CC ₅₀	261 µg/mL	331 µg/mL
	SI	3.14	2.01
Hemolysis	HC ₅₀	225 µg/mL	150 µg/mL
	SI	2.70	0.89

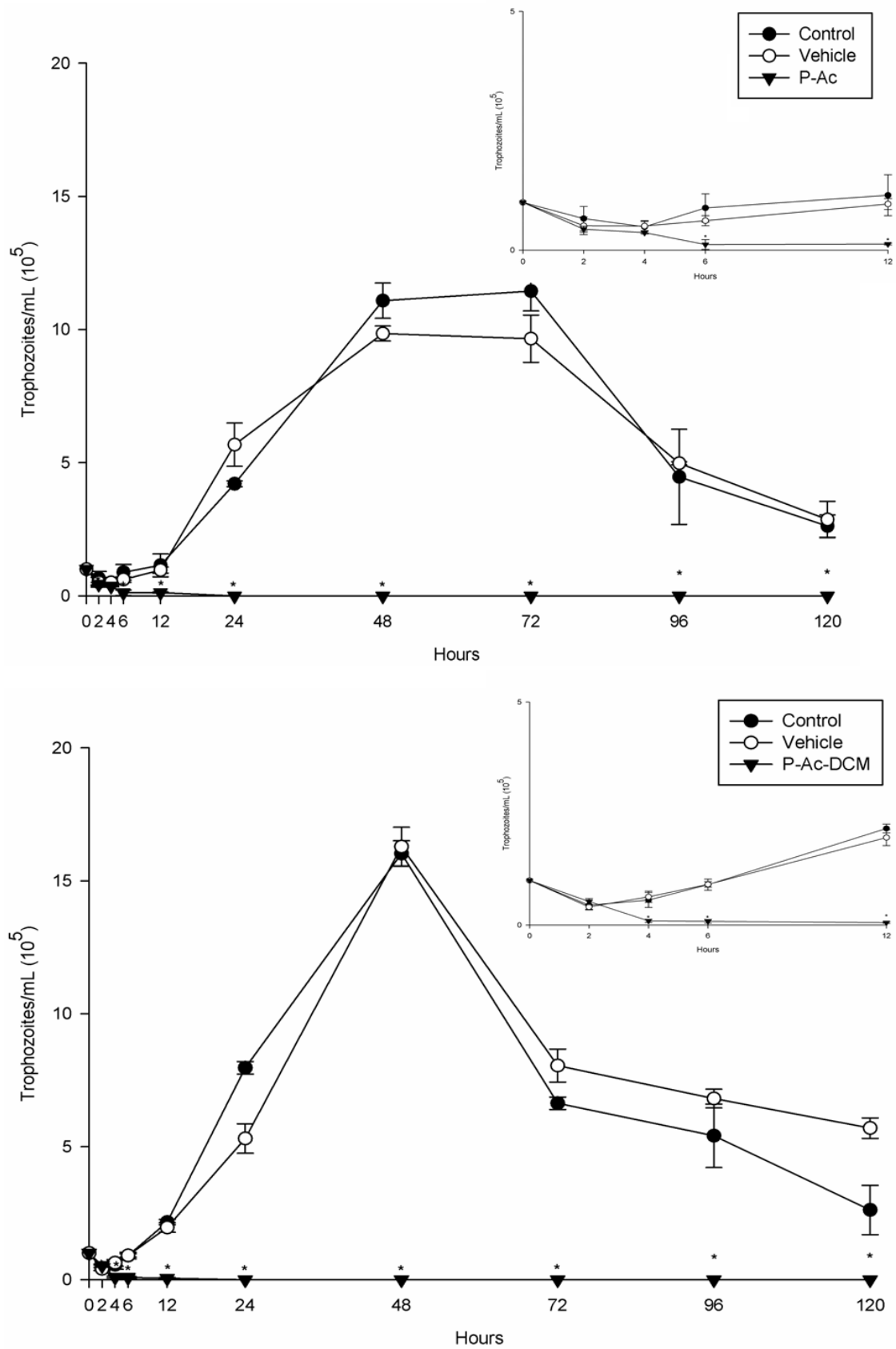


Figure 1: Effect of ethyl acetate (P-Ac) and ethyl acetate with dichloromethane (P-Ac-DCM) fractions of brown propolis in *T. vaginalis* kinetic growth at MIC value, in comparison to untreated parasites (control) and parasites with 0.6% DMSO (vehicle). Data represent mean \pm

standard deviation of three experiments in triplicate. (*) Statistically significant difference ($p < 0.05$) when compared to the negative control by the Student's t-test.

PARECER DA ORIENTADORA:

A bolsista de iniciação científica voluntária Micheli Ferla desempenhou as atividades com assiduidade, dedicação e independência. Neste período, a Micheli testou frações de própolis frente o parasito *Trichomonas vaginalis* e os resultados deram origem ao seu trabalho de conclusão de curso apresentado em dezembro de 2018. A Micheli foi aprovada para cursar o Mestrado Acadêmico no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF/UFRGS) sob minha orientação, dando continuidade ao estudo das frações de própolis na atividade anti-*T. vaginalis*. Neste contexto, a Micheli tem a oportunidade de aprendizado de diversas técnicas importantes em biologia celular, com a previsão de realização de técnicas de biologia molecular, a qual ela tem aproveitado e correspondido com muito êxito, o que leva ao encerramento do período com bolsista voluntária para iniciar sua carreira de pesquisadora na pós-graduação *stricto sensu*.