

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**Avaliação da atividade tricomonicida do derivado clorado do metronidazol
sobre cepa sensível e resistente de
*Trichomonas vaginalis***

Michelle de Oliveira Chacon

Belo Horizonte – MG

2016

Michelle de Oliveira Chacon

**Avaliação da atividade tricomonicida do derivado clorado do metronidazol
sobre cepa sensível e resistente de
*Trichomonas vaginalis***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Parasitologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais – UFMG.

Orientadora: Prof^a. Maria Aparecida Gomes
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

2016

“É preciso amor

Pra poder pulsar

É preciso paz pra poder sorrir

É preciso a chuva para florir”

(Almir Sater)

Trabalho realizado no Laboratório de Amebíase do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio financeiro da FAPEMIG e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, na pessoa de seu coordenador Professor Ricardo Fujiwara, pela oportunidade concedida, confiança, formação e aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e capacidade de superar desafios;

À Cidinha pela oportunidade, orientação, torcida e por acreditar em mim;

À Thaisa, minha querida amiga e companheira de desafios, muito obrigada pelo apoio durante todo o meu trajeto no laboratório de Amebíase. Este trabalho é nosso!!

Samanta e Marina pelo compromisso e dedicação. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho;

Ao Joãozinho pelo imenso ensinamento e carinho diariamente;

Aos amigos do Laboratório Joice, Lú, Fred, Dirce, Mayana, Edna, Fabrício, Aninha pelo companheirismo e por deixar meus dias mais alegres e divertidos;

Ao professor Ricardo José e ao Lucas Lopardi pela parceria, e principalmente confiança;

Aos professores Geovanni Cassali, Carlos Tagliati, Luciano Capettini, e ao aluno Diego pela valiosa colaboração;

À professora Maria de Fátima Leite e seus alunos pela agradável receptividade em seu laboratório;

Aos professores do Departamento de Parasitologia pelo conhecimento compartilhado;

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Sumara e Sibeles, pela atenção em todos os momentos;

Aos amigos da turma de mestrado pela divertida rotina, troca de experiências e carinho;

À CAPES pelo fornecimento da bolsa de estudos;

À minha mãe, meu exemplo de força, amor e honestidade. Obrigada por sempre me incentivar e principalmente acreditar em mim!

Às minhas amigas Carla e Tamara, obrigada por estarem sempre presentes!

Ao meu amor, Rodrigo, obrigada por existir em minha vida!! Seu carinho, atenção e amor foram essenciais para a conclusão desta etapa!

À todos que passaram por mim durante o mestrado, colaborando, mesmo que indiretamente, para meu crescimento pessoal e profissional;

Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
RESUMO.....	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 <i>Trichomonas vaginalis</i>	18
1.2 Tricomoníase	20
1.2.1 Patogenicidade.....	22
1.2.2 Manifestações clínicas.....	24
1.2.2.1 Na mulher	24
1.2.2.2 No homem	25
1.2.3 Complicações clínicas	26
1.2.3.1 Problemas relacionados com a gravidez.....	26
1.2.3.2 HIV	27
1.2.4 Diagnóstico.....	28
1.2.4.1 Microscopia	29
1.2.4.2 Cultura	29
1.2.4.3 Colpocitopatologia - Papanicolaou.....	31
1.2.4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	32
1.2.4.5 Detecção de antígeno.....	33
1.2.5 Tratamento.....	34
1.3 Nitroimidazóis	35
1.3.1 Metronidazol (MTZ).....	35
1.3.2 Tinidazol (TNZ)	38
1.4 Resistência	39
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	44

3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Cepas de <i>T. vaginalis</i>	45
4.2 Manutenção do parasito	45
4.3 Síntese de MTZ-Cl	45
4.4 Padronização do inóculo	46
4.5 Preparo das soluções	47
4.5.1 Solução para teste com MTZ e a cepa JT	47
4.5.2 Solução para teste com MTZ-Cl e a cepa JT	47
4.5.3 Solução para teste com MTZ e a cepa CDC 085	48
4.5.4 Solução para teste com MTZ-Cl e a cepa CDC 085	48
4.6 Ensaio de inibição in vitro	48
4.7 Análise estatística	49
4.8 Avaliação de citotoxicidade	50
4.9 Avaliação da toxicidade oral aguda	50
4.10 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	52
4.10.1 Preparo da placa	52
4.10.2 Preparo dos parasitos	53
4.10.3 Preparo das soluções	53
4.10.4 Microscopia de fluorescência	53
5 RESULTADOS	55
5.1 Padronização do inóculo	55
5.2 Potencial de inibição	55
5.2.1 Cepa JT	55
5.2.1.1 Teste com MTZ	55
5.2.1.2 Teste com MTZ-Cl	60
5.2.2 Cepa CDC 085	64
5.2.2.1 Teste com MTZ	64

5.2.2.2 Teste com MTZ-Cl.....	68
5.3 Citotoxicidade.....	73
5.4 Toxicidade aguda.....	74
5.5 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	80
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÃO.....	88
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- A) TROFOZOÍTOS DE <i>T. vaginalis</i> OBTIDOS DE CULTURA, CORADO POR GIEMSA; B) TROFOZOÍTO DE <i>T. vaginalis</i> OBTIDO DE ESFREGAÇO VAGINAL, CORADO POR GIEMSA.....	18
FIGURA 2 - CICLO DE VIDA DE <i>T. vaginalis</i>	20
FIGURA 3- ESTIMATIVA DE INCIDÊNCIA ANUAL DE TRICOMONÍASE ENTRE INDIVÍDUOS DE 15-49 ANOS, NAS DIFERENTES REGIÕES DO MUNDO (KENYON ET AL., 2014).	21
FIGURA 4- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE <i>T. vaginalis</i>	23
FIGURA 5- MÉTODO <i>INPOUCH</i> DE DIAGNÓSTICO DE <i>T. vaginalis</i>	31
FIGURA 6- TESTE RÁPIDO DE DETECÇÃO DE ANTÍGENO DE <i>T. vaginalis</i> (OSOM TV®).	33
FIGURA 7- TESTE DE DETECÇÃO DE VAGINOSSES AFFIRM VPIII BD®.....	34
FIGURA 8- FÓRMULA ESTRUTURAL DO MTZ	35
FIGURA 9- METABOLISMO DO PIRUVATO E ATIVAÇÃO DO MTZ NOS HIDROGENOSSOMOS DE <i>T. vaginalis</i>	36
FIGURA 10- FÓRMULA ESTRUTURAL TINIDAZOL	38
FIGURA 11- ESQUEMA DE SÍNTESE DO MTZ-CL.....	46
FIGURA 12- FLUXOGRAMA DE TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM DOSE INICIAL DE 300MG/KG (OECD 423).....	51
FIGURA 13- A) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ 24H PARA A CEPA JT (INIBIÇÃO X CONCENTRAÇÃO). B) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ 24H PARA A CEPA JT (INIBIÇÃO X LN[CONCENTRAÇÃO])	56
FIGURA 14- A) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ 48H PARA A CEPA JT (INIBIÇÃO X CONCENTRAÇÃO). B) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ 48H PARA A CEPA JT (INIBIÇÃO X LN [CONCENTRAÇÃO]).	58
FIGURA 15- A) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ-CL 24H PARA A CEPA JT (INIBIÇÃO X CONCENTRAÇÃO). B) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ-CL 24H PARA A CEPA JT (INIBIÇÃO X LN[CONCENTRAÇÃO]).	60
FIGURA 16- A) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ-CL 48H PARA CEPA JT (INIBIÇÃO X CONCENTRAÇÃO). B) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ-CL 48H PARA CEPA JT (INIBIÇÃO X LN[CONCENTRAÇÃO])	62

FIGURA 17- A) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ 24H PARA A CEPA CDC 085 (INIBIÇÃO X CONCENTRAÇÃO). B) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ 24H PARA A CEPA CDC 085 (INIBIÇÃO X LN[CONCENTRAÇÃO])	64
FIGURA 18- A) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ 48H PARA A CEPA CDC 085 (INIBIÇÃO X CONCENTRAÇÃO). B) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ 48H PARA A CEPA CDC 085 (INIBIÇÃO X LN[CONCENTRAÇÃO])	66
FIGURA 19- A) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ-CL 24H PARA A CEPA CDC 085 (INIBIÇÃO X CONCENTRAÇÃO). B) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ-CL 24H PARA A CEPA CDC 085 (INIBIÇÃO X LN[CONCENTRAÇÃO])	68
FIGURA 20- A) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ-CL 48H PARA A CEPA CDC 085 (INIBIÇÃO X CONCENTRAÇÃO). B) GRÁFICO DE DISPERSÃO MTZ-CL 48H PARA A CEPA CDC 085 (INIBIÇÃO X LN [CONCENTRAÇÃO])	70
FIGURA 21- MÉDIA DE ABSORBÂNCIA E PORCENTAGEM DE VIABILIDADE DO COMPOSTO MTZ-CL, EM CONCENTRAÇÕES ENTRE 0,2-25,6 MM, EM TESTE MTT.	73
FIGURA 22- PORCENTAGEM DE VIABILIDADE CELULAR EM TESTE (MTT) DO MTZ-CL EM CÉLULA HEPÁTICA HUMANA (SK-HEP).....	73
FIGURA 23- ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO CORAÇÃO. A) CONTROLE, B) CONTROLE-SOLVENTE, C) MTZ, D) MTZ-CL. HE, 20X- SEM ALTERAÇÕES APARENTES.....	75
FIGURA 24- ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO PULMÃO. A) CONTROLE, B) CONTROLE-SOLVENTE, C) MTZ, D) MTZ-CL. HE, 20 X. SEM ALTERAÇÕES APARENTES.....	76
FIGURA 25- ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO SNC. A) CONTROLE, B) CONTROLE-SOLVENTE, C) MTZ, D) MTZ-CL. HE, 20X- SEM ALTERAÇÕES APARENTES.....	77
FIGURA 26- ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO RIM. A) CONTROLE, B) CONTROLE-SOLVENTE, C) MTZ, D) MTZ-CL. HE, 40X- SEM ALTERAÇÕES APARENTES.....	78
FIGURA 27 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO. A) CONTROLE, B) CONTROLE-SOLVENTE, C) MTZ, D) MTZ-CL. HE, 20X. SETAS REPRESENTAM HEPATÓCITOS COM DEGENERAÇÃO HIDRÓPICA. PONTAS DE SETAS REPRESENTAM HEPATÓCITOS COM ESTEATOSE.	79

FIGURA 28- DETECÇÃO DE RADICAIS LIVRES EM *T. vaginalis*, CEPA JT. A)

CONTROLE, **B)** MTZ (0,027 MM), **C)** MTZ (0,229 MM) E **D)** MTZ-CL (0,027 MM).

SONDA DHE, AUMENTO DE 63X.....80

FIGURA 29- GRÁFICO DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA EM CÉLULAS DE

T. vaginalis TRATADAS COM MTZ E MTZ-CL. VALORES REPRESENTADOS NO

GRÁFICO FORAM NORMALIZADOS DE ACORDO COM SEUS RESPECTIVOS

CONTROLES.81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- MASSA MOLAR DO MTZ E DO MTZ-CL	46
TABELA 2- MODELO DE REGRESSÃO FINAL MTZ 24H (CEPA JT).....	56
TABELA 3- ESTIMATIVA INTERVALAR DA CI_{50} DE MTZ (24H) PARA CEPA JT.....	58
TABELA 4- MODELO DE REGRESSÃO FINAL MTZ 48H (CEPA JT).....	59
TABELA 5- ESTIMATIVA INTERVALAR DA CI_{50} DE MTZ (48H) PARA CEPA JT.....	60
TABELA 6 - MODELO DE REGRESSÃO FINAL MTZ-CL 24H (CEPA JT).	611
TABELA 7- ESTIMATIVA INTERVALAR DA CI_{50} DE MTZ-CL (24H) PARA CEPA JT.	62
TABELA 8- MODELO DE REGRESSÃO FINAL MTZ-CL 48H (CEPA JT).	63
TABELA 9- ESTIMATIVA INTERVALAR DA CI_{50} MTZ-CL (48H) PARA CEPA JT.....	64
TABELA 10- MODELO DE REGRESSÃO FINAL MTZ 24H (CEPA CDC 085).	65
TABELA 11- ESTIMATIVA INTERVALAR DA CI_{50} DE MTZ (24H) PARA CEPA CDC 085.....	66
TABELA 12- MODELO DE REGRESSÃO FINAL MTZ 48H (CEPA CDC 085).	67
TABELA 13- ESTIMATIVA INTERVALAR DA CI_{50} DE MTZ (48H) PARA CEPA CDC 085.....	68
TABELA 14- MODELO DE REGRESSÃO FINAL MTZ-CL 24H (CEPA CDC 085).....	69
TABELA 15- ESTIMATIVA INTERVALAR DA CI_{50} MTZ-CL (24H) PARA CEPA CDC 085.....	70
TABELA 16- MODELO DE REGRESSÃO FINAL DE MTZ-CL 48H (CEPA CDC 085)..	71
TABELA 17- ESTIMATIVA INTERVALAR DA CI_{50} MTZ-CL (48H) PARA CEPA CDC 085.....	72
TABELA 18- VALOR DE CI_{50} (μ M) DE MTZ E MTZ-CL PARA AS CEPAS JT E CDC 085 DE <i>T. vaginalis</i> EM INTERVALO DE 24 E 48 H	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de Variância

ATCC: *American Type Culture Collection*

CDC: *Center for Disease Control and Prevention*

CDF: *Cell Detaching Factor*

CEUA: Comitê de Ética em Uso Animal

CI₅₀: Concentração Inibitória de 50%

CP: Cisteína proteinase

DHE: *Dihydroethidium*

DL₅₀: Dose letal de 50%

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DST: Doença sexualmente transmissível

EUA: Estados Unidos da América

FDA: *Food and Drug Administration*

g: Grama

HE: Hematoxilina-Eosina

HIV: *Human immunodeficiency virus*

HSV: Herpes Simplex Virus

h: Hora

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

Ig: Imunoglobulina

Kg: Quilograma

L: Litro

Ln: Logaritmo natural

MTT: Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

MTZ: Metronidazol

MTZ-Cl: Derivado clorado do Metronidazol

mg: Miligrama

mL: Mililitro

mm: Milímetro

OECD: *Organization for Economic Co-operation and Development*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Tampão salino fosfato

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PFOR: Piruvato-ferredoxina oxidorreductase

RNA: Ácido ribonucléico

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SNC: Sistema Nervoso Central

SOCl₂: Cloreto de tionila

TNZ: Tinidazol

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

μL: Microlitro

μM: Micromolar

μm: Micrômetro

°C: Graus Celsius

RESUMO

O *Trichomonas vaginalis* é o agente etiológico da doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum do mundo, a tricomoníase. Essa doença tem sido encontrada associada a outras DSTs, mostrando-se um cofator importante para a transmissão e aquisição do vírus da imunodeficiência humana. O metronidazol (MTZ) é hoje o fármaco mais utilizado no tratamento da tricomoníase, no entanto, seu uso inadequado com administrações de níveis sub-terapêuticos, normalmente prescritos como profilaxia, podem favorecer o surgimento de resistência. Casos refratários ao tratamento têm sido descritos e constituem barreira importante para o sucesso do tratamento não só da tricomoníase, como também de outras infecções, considerando principalmente as poucas opções terapêuticas disponíveis. Em contrapartida, é sugerido o aumento da dose terapêutica do MTZ, contudo, suas altas dosagens podem levar a uma potencialização dos efeitos adversos, tornando-os, em alguns casos, intoleráveis ao uso. Em busca de novos tratamentos com substâncias mais potentes e menos tóxicas foi sintetizado e testado o derivado clorado do MTZ (MTZ-Cl). Ensaio de inibição *in vitro* demonstraram interessantes resultados quando comparado ao MTZ, apresentando CI_{50} até 11 vezes menor que sua molécula precursora para cepas de *T. vaginalis* sensível e resistente ao MTZ. Foi avaliada a segurança do MTZ-Cl por teste de citotoxicidade em células hepáticas e toxicidade aguda para roedores. Não foi observada toxicidade no teste *in vitro*. Na análise *in vivo* foi observada uma maior duração na sonolência do grupo MTZ-Cl e pequena alteração hepática em um dos animais tratados com o derivado clorado do MTZ, não sendo observadas demais diferenças entre o precursor e o seu derivado. Não houve mortes entre os animais tratados, não sendo possível, portanto, a determinação da DL_{50} . Considerando que a dose utilizada durante o teste com MTZ foi muito superior ao preconizado para o tratamento da tricomoníase, e ao extrapolar essa análise para o MTZ-Cl conclui-se que a dose utilizada durante o teste é ainda mais destoante, pois se trata de uma molécula com maior potência. Com isso, podemos especular que as concentrações tóxicas do MTZ-Cl excedam em muito as potencialmente terapêuticas. Diferenças de atuação dos dois compostos foram avaliados para a formação de radicais livres citotóxicos, onde foi observada maior formação de radicais livres nos parasitos tratados com MTZ-Cl. Nossos resultados sinalizam o grande potencial do MTZ-Cl como terapia tricomonicida, sendo uma alternativa promissora para futuros estudos clínicos.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*, tricomoníase, metronidazol, resistência, derivado do metronidazol, toxicidade

ABSTRACT

The *Trichomonas vaginalis* is the etiologic agent of the most common non-viral sexually transmitted disease (STD) in the world, the trichomoniasis. This disease has been associated with other STDs, evidencing an important co-factor for the transmission and acquisition of the *Human Immunodeficiency Virus*. The metronidazole (MTZ) is currently the most used drug in the treatment of trichomoniasis. However, its usage is inappropriate with administrations at sub-therapeutics levels, usually prescribed as prophylaxis, and might support the emergence of resistance. Refractory cases of treatment have been described and constitute an important barrier to the success of the treatment, not only for trichomoniasis, but also for other infectious diseases, mainly considering the lack of therapeutic options. In contrast, it is suggested the increase of the MTZ therapeutic doses, even though the higher doses might lead to severe collateral effects, making the usage intolerable in some cases. In the search for treatments with more potent and less toxic molecules, the chlorine analogous of MTZ (MTZ-Cl) was synthesized and tested. *In vitro* inhibitions assays exhibited interesting results compared to MTZ, showing IC₅₀ up to 11-fold lower than the precursor molecule for *T. vaginalis* sensitive and MTZ-resistant strains. The safety of MTZ-Cl was evaluated by cytotoxic assay in hepatic cells, and acute toxicity in rodents. *In vitro* assay did not indicate any toxicity. *In vivo* analyses revealed a small hepatic alteration in one of the animals treated with MTZ-Cl, but other differences between this molecule and its precursor was not observed. There were no deaths among the treated animals, thus the LD₅₀ was not possible to be determined. Considering that the dose used during the test with MTZ was much higher than the recommended for the treatment of trichomoniasis, and extrapolating this analysis to MTZ-Cl, it is noteworthy that the dose used during the test is even more significant, since this is a more potent molecule. Thereby we can speculate that the toxic concentrations of MTZ-Cl far exceed those potentially therapeutics. Differences in the action of both drugs were evaluated by the formation of cytotoxic free radicals, where there was a higher formation of free radicals in the parasites treated with MTZ-Cl. Our results indicate a great potential of MTZ-Cl as a trichomonocidal therapy, and a promising alternative for further clinical trials.

Key-words: *Trichomonas vaginalis*, trichomoniasis, metronidazole, resistance, metronidazole derivative, toxicity

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis é um protozoário pertencente ao filo Sarcomastigophora, à classe Zoomastigophorea da ordem Trichomonadida e a família Trichomonadidae (FEITOSA & CONSULARO, 2005). Ele foi descrito pela primeira vez em 1836 pelo médico europeu Alfred Donné (COLEMAN *et al.*, 2013). Atualmente sabe-se que três espécies de *Trichomonas* podem ser encontradas parasitando humanos: *T. vaginalis*, *T. tenax* e *T. hominis*. Entretanto, somente a primeira espécie é considerada patogênica e capaz de infectar o trato urogenital humano (SCHWEBKE, 2002; ZORATI & MELLO, 2009).

Trata-se de um parasito monoxênico, flagelado, unicelular, piriforme que se multiplica por divisão binária longitudinal (BARROS, 2002; JESUS & SILVA FILHO, 2005; ZORATI & MELLO, 2009). Ele apresenta de 10-20 µm de comprimento e 2-14 µm de largura. Em culturas axênicas, o parasito tende a se revelar em uma forma mais uniforme e oval, enquanto que quando encontrado aderido ao epitélio vaginal a sua aparência assume uma forma mais amebiana (Figura 1) (MALLA *et al.*, 2001). O *T. vaginalis* possui quatro flagelos anteriores desiguais em tamanho e uma membrana ondulante que se adere ao corpo pela parte posterior (FEITOSA & CONSULARO, 2005). Sob condições de crescimento não favoráveis, o parasito pode arredondar-se e interiorizar seus flagelos (MALLA *et al.*, 2001).

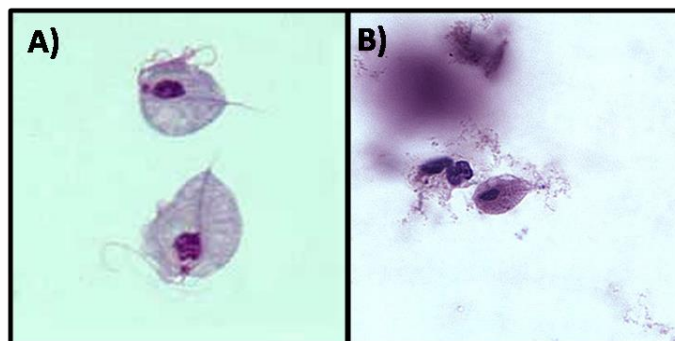


Figura 1- A) Trofozoítos de *T. vaginalis* obtidos de cultura, corado por Giemsa; B) Trofozoíto de *T. vaginalis* obtido de esfregaço vaginal, corado por Giemsa.

Fonte: <http://www.cdc.gov/std/trichomonas/stdfact-trichomoniasis.htm> (adaptado)

T. vaginalis é um micro-organismo anaeróbio facultativo, possui bom crescimento na faixa de pH entre 5 e 7,5 e entre as temperaturas de 20 a 40°C. Ele é capaz de manter glicogênio em reserva como forma de energia. Essas características do protozoário são importantes para a sua colonização no ambiente vaginal, já que esse local é constantemente modificado devido a variações de pH, hormônios, menstruação e fornecimento de nutrientes (MACIEL *et al.*, 2004).

Parasita obrigatório, ele é capaz de fagocitar bactérias, células epiteliais vaginais e eritrócitos, podendo ainda ser fagocitado por macrófagos (KISSINGER, 2015). *T. vaginalis* usa carboidratos como sua principal fonte de energia através do metabolismo fermentativo em condições anaeróbias e de microaerofilia (KISSINGER, 2015). Diferentemente da maioria dos eucariotos, *T. vaginalis* não apresenta mitocôndrias, mas sim grânulos densos chamados de hidrogenossomos. Essas estruturas são importantes no metabolismo de carboidratos, já que possui a enzima piruvato ferredoxina oxirredutase, responsável por transformar o piruvato em acetato, por oxidação fermentativa, liberando energia na forma de ATP (BRAVO *et al.*, 2010). Os hidrogenossomos são organelas esféricas ou ligeiramente alongadas, mas quando submetidos a qualquer tratamento medicamentoso a sua morfologia é prontamente alterada, apresentando um significativo aumento de tamanho, saindo de um diâmetro médio de 300 nm para um diâmetro de 2 µm, bem como outras alterações na matriz celular (BENCHIMOL, 2008).

O ciclo de vida do *T. vaginalis* é simples, apresentando apenas uma forma biológica, a de trofozoíto, não apresentando portando, a fase cística (Figura 2) (MALLA *et al.*, 2001). Ele é o agente etiológico da tricomoníase onde sua transmissão se dá principalmente por meio de relações sexuais (ALMEIDA *et al.*, 2010; COLEMAN *et al.*, 2013).

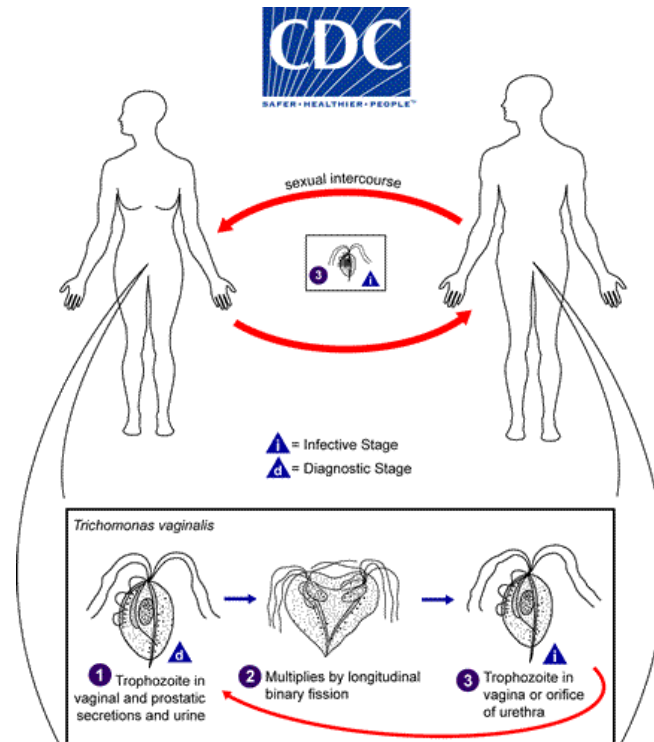


Figura 2 - Ciclo de vida de *T. vaginalis*: *T. vaginalis* reside no trato genital feminino inferior e na uretra masculina e próstata ❶, onde se replica por divisão binária ❷. O parasito não apresenta a forma cística e não sobrevive bem em ambientes extremos. *T. vaginalis* é transmitido entre humanos, o seu único hospedeiro conhecido, principalmente através de relações sexuais. ❸.

Fonte: <http://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>

1.2 Tricomoníase

A tricomoníase é a doença sexualmente transmissível (DST) não-viral mais comum no mundo (KISSINGER *et al.*, 2009). A sua transmissão ocorre principalmente através de relações sexuais, embora outros mecanismos de propagação também possam estar envolvidos, como: veiculação do protozoário através de fômites e a transmissão vertical através do parto normal, os quais explicam a existência da infecção em recém-nascidos e indivíduos em ausência de atividade sexual (ALMEIDA *et al.*, 2010; COLEMAN *et al.*, 2013).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que ocorram anualmente cerca de 248 milhões de casos de tricomoníase em todo o mundo, em indivíduos entre 15 e 49 anos (OMS, 2011), com a grande maioria identificada em mulheres (92%) (MACIEL *et al.*, 2004). Kenyon e colaboradores demonstraram que, embora em diferentes graus de incidência, a tricomoníase está presente em todas as regiões do mundo (Figura 3)

(KENYON *et al.*, 2014). A região africana contribui com 32% da incidência mundial estimada pela OMS em 2005 (OMS, 2011), enquanto que nos Estados Unidos (EUA) cerca de 7,4 milhões de novos casos ocorrem anualmente (NWEZE & MOUNEKE, 2011). No Brasil a incidência anual é de 4,4 milhões de casos (ALMEIDA *et al.*, 2010; PASSOS *et al.*, 2010). Apesar da elevada ocorrência descrita para a tricomoníase, esses dados são ainda limitados e não refletem com total clareza a realidade da doença no mundo já que se trata de uma doença de notificação não obrigatória e que, portanto deve apresentar números de casos ainda mais elevados (QUINLIVAN *et al.*, 2012).

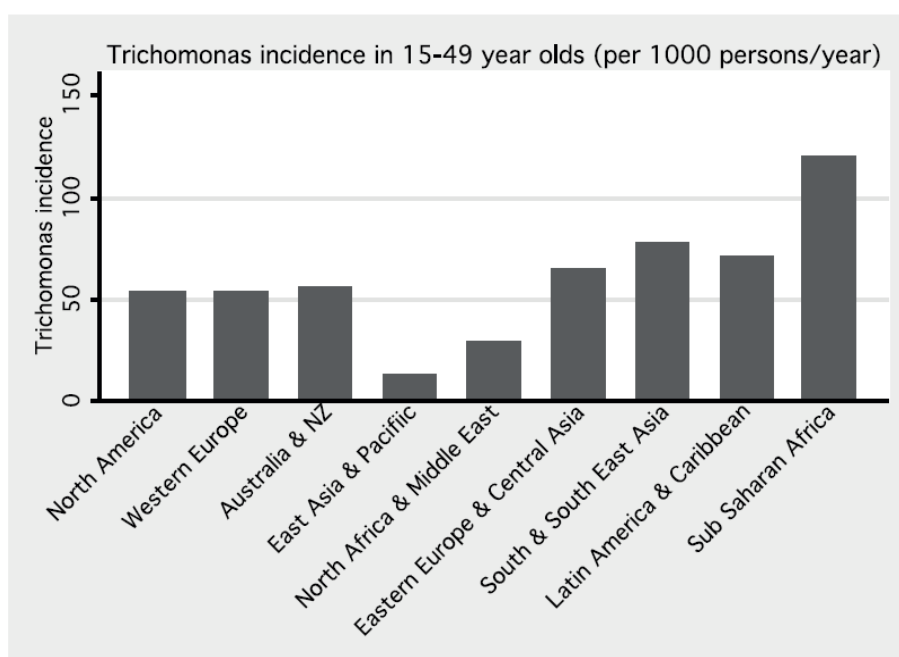


Figura 3- Estimativa de incidência anual de tricomoníase entre indivíduos de 15-49 anos, nas diferentes regiões do mundo (KENYON *et al.*, 2014).

A tricomoníase é uma doença negligenciada e alguns profissionais ainda questionam a sua importância (FEITOSA & CONSULARO, 2005). Entretanto, já se sabe que *T. vaginalis* está associado a graves complicações de saúde como nascimentos prematuros, baixo peso em bebês, doença inflamatória pélvica atípica, neoplasia cervical, infertilidade e um maior risco de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ALVES, 2011). Em um levantamento em clínicas de tratamento de DST's nos EUA (2010-2011), a taxa de positividade para tricomoníase foi de 26,2% entre os sintomáticos, 6,5% entre os assintomáticos e 29% em mulheres HIV positivas (MEITES *et al.*, 2013).

1.2.1 Patogenicidade

Embora o parasito tenha sido relatado por Donné em 1836, sua relação com a infecção vaginal são foi descrita após 80 anos. A doença abrange uma larga gama de sintomas que variam desde um estado de irritação a inflamação grave, com a presença de secreção espumosa e fétida, além de um relativo estado de portador assintomático (PETRIN *et al.*, 1998).

A patogenicidade do parasito está diretamente relacionada à sua capacidade de cito-aderência, o que é essencial para o sucesso de sua colonização e persistência no aparelho urogenital (Figura 4) (MALLA *et al.*, 2001). Estudos demonstram que o contato do *T. vaginalis* com células de mamíferos resultam em uma maior transcrição de moléculas de adesão e que o parasito assume uma forma achatada, essencialmente laminar, sobre a célula hospedeira (SCHWEBKE & BURGESS, 2004). A superfície c lular do parasito é um mosaico de adesinas, proteínas e carboidratos que fornecem a base para a ligação com o seu receptor. A adesão do *T. vaginalis*   célula epitelial parece ser mediada através de quatro proteínas de adesão: AP65, AP51, AP33, e AP23, que atuam de forma específica e são dependentes de tempo, temperatura e pH. A aderência concentra-se no lado oposto à membrana ondulante, porém as proteínas de ligação estão amplamente distribuídas em toda a superfície do parasito (PETRIN *et al.*, 1998; MALLA *et al.*, 2001).

Outra classe de moléculas que participa na adesão de *T. vaginalis* são as cisteína-proteinases (CP). As CPs são citotóxicas, hemolíticas e têm a capacidade de degradar IgG, IgM e IgA presentes na vagina (MACIEL *et al.*, 2004). Elas estão presentes em grande quantidade no *T. vaginalis*, sendo ele o parasito mais rico nesse tipo de proteinase (ADEGBAJU & MORENIKEJI, 2008).

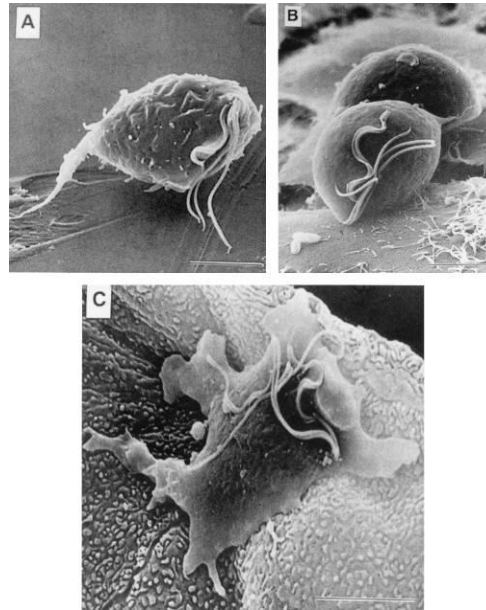


Figura 4- Microscopia eletrônica de varredura de *T. vaginalis*. **A)** *T. vaginalis* visto em meio de cultura sob microscopia de varredura. O axóstilo, membrana ondulante e flagelos são visíveis. **B)** *T. vaginalis* na superfície de uma célula epitelial vaginal antes da transformação amebóide. **C)** Morfologia amebóide de *T. vaginalis* em cultura de células. Nota-se que o lado oposto da membrana ondulante é que adere à célula epitelial vaginal. Escala, 5 μ m (PETRIN *et al.*, 1998).

Tanto a síntese de adesinas, quanto o funcionamento das proteinases são moduladas pela presença de ferro e, para a aquisição do mesmo, o parasito provoca a hemólise de eritrócitos. Essa hemólise pode ser mediada tanto por fagocitose, quanto pela inserção de poros na membrana da hemácia através de proteínas do tipo perforinas (MACIEL *et al.*, 2004).

Outro fator responsável pela patogenicidade do parasito está relacionado com o CDF (*Cell-detaching factor*). O CDF é uma glicoproteína sintetizada e secretada pelo *T. vaginalis* responsável pela ocorrência de descamação tecidual durante a infecção (GARBER & LEMCHUK-FAVEL, 1990). Foi demonstrado que os níveis de CDF estão relacionados com a gravidade dos sintomas clínicos de vaginite, sendo que seu aumento foi associado a uma piora do estado clínico do paciente (PETRIN *et al.*, 1998). Uma hipótese para justificar a ausência de sintomas em alguns indivíduos infectados pode ser dada pela baixa produção dessa glicoproteína (GARBER & LEMCHUK-FAVEL, 1990). A produção de CDF é influenciada pela concentração de estrógenos na vagina, o que justifica a aplicação intravaginal de pellets do hormônio para amenização dos sinais clínicos, sem, no entanto, erradicar a infecção (MACIEL *et al.*, 2004).

A capacidade de evadir do sistema imune humano também é um aspecto importante na patogenicidade do *T. vaginalis*. Durante a menstruação há uma diminuição no número de micro-organismos infectantes, embora haja um aumento nos fatores de virulência mediados pelo ferro (MACIEL *et al.*, 2004). O sangue menstrual representa a única fonte de complemento na vagina, no entanto, o ferro é um fator que contribui na resistência às proteínas do sistema do complemento (PETRIN *et al.*, 1998). A elevada concentração de ferro pode ter ação na super-regulação da expressão de CPs, o que resulta em uma pronunciada degradação da porção C3 do complemento permitindo, dessa forma, que o micro-organismo escape da resposta imune do hospedeiro (ADEGBAJU & MORENIKEJI, 2008). Além disso, o parasito pode revestir-se de proteínas plasmática do hospedeiro, impedindo que o sistema imune o reconheça como estranho. Assim os mecanismos do sistema imunológico, tais como a apresentação de antígeno mediada pelo complemento e lise, não ocorrerão (MACIEL *et al.*, 2004).

1.2.2 Manifestações clínicas

1.2.2.1 Na mulher

A tricomoníase apresenta grande variabilidade de manifestações patológicas, desde um quadro assintomático até um estado de severa inflamação, tendo como principais sítios de infecção o epitélio escamoso da vagina e a ectocérvice uterina (MACIEL *et al.*, 2004; SCHWEBKE & BURGESS, 2004; FEITOSA & CONSOLARO, 2005).

A infecção por *T. vaginalis* na mulher parece estar associada a uma diminuição dos lactobacilos produtores de ácido e consequentemente ao aumento no valor de pH local, passando de 4,5 para maior que 5 (PETRIN *et al.*, 1998). O aumento do pH vaginal e cervical logo antes e durante o período menstrual favorece a infecção pelo parasito (FEITOSA & CONSOLARO, 2005). O número de mulheres assintomáticas está entre 25 e 50% dos casos, sendo que estas apresentam pH vaginal e microbiota normal. Porém, um terço das pacientes assintomáticas acaba evoluindo para um quadro sintomático dentro de seis meses (MACIEL *et al.*, 2004). O período de incubação da tricomoníase ocorre entre 4 a 28 dias em cerca de 50% dos indivíduos infectados (PETRIN *et al.*, 1998; COLEMAN *et al.*, 2013).

Mulheres com vaginite causada por *T. vaginalis* frequentemente tem corrimento devido à infiltração por leucócitos, além de prurido e irritação (MACIEL *et al.*, 2004). O sintoma clássico de corrimento amarelo, abundante, muco-purulento e espumoso ocorre somente em 20% dos casos (FEITOSA & CONSOLARO, 2005). A infecção manifesta-se com prurido em 25-50% e com disúria em 30-50% dos casos (MALLA *et al.*, 2001). Metade das pacientes com tricomoníase relatam apresentar odor característico da infecção. O quadro de edema e eritema é observado de 22 a 37% dos casos (SCHWEBKE & BURGESS, 2004).

Pontos hemorrágicos na parede cervical, conhecidos como *colpitis macularis*, ou cérvix em aspecto de morango, é o sinal específico da tricomoníase, porém, embora essa aparência seja altamente específica, ela é observada em poucas mulheres (2 a 5%) e sua detecção é realizada com maior confiabilidade apenas pela colposcopia (MACIEL *et al.*, 2004; SCHWEBKE & BURGESS, 2004; FEITOSA & CONSOLARO, 2005). Todos os sinais e sintomas decorrentes da tricomoníase têm característica cíclica e são agravados durante o período menstrual (PETRIN *et al.*, 1998).

Os fatores que influenciam na resposta inflamatória do hospedeiro não estão completamente elucidados, mas podem incluir níveis hormonais, microbiota vaginal, virulência da cepa e a concentração relativa dos organismos presentes na vagina (SCHWEBKE & BURGESS, 2004).

Na infecção crônica, os sintomas são predominantemente leves, com prurido e dispareunia (dor durante a relação sexual), enquanto a secreção vaginal pode ser muito escassa e com presença de muco. Esta forma da doença é particularmente importante do ponto de vista epidemiológico, pois, esses indivíduos são a principal fonte de transmissão do parasito (PETRIN *et al.*, 1998; MACIEL *et al.*, 2004).

1.2.2.2 No homem

Diferentemente da mulher, homens infectados pelo *T. vaginalis* comumente apresentam apenas infecção auto-limitada, apresentando-se assintomático em 75% dos casos (MACIEL *et al.*, 2004; COLEMAN, 2013). Os homens têm, portanto, um papel importante como disseminador da parasitose, atuando como um ativo transmissor da doença (HARP & CHOWDHORY, 2011). A baixa persistência do parasito no organismo masculino pode ser

explicada pela presença de zinco no líquido prostático que pode ser letal para o protozoário, contudo, sub-concentrações de zinco ou organismos resistentes ao mesmo, pode ser uma explicação para os casos sintomáticos entre homens (BENCHIMOL, 2008).

Prostatite, balanopostite (infecção da glândula e do prepúcio), cistite e epididimite, são complicações que podem ser atribuídas ao *T. vaginalis*. Este protozoário pode se localizar ainda nas vesículas seminais e nos testículos (FEITOSA & CONSOLARO, 2005). Em homens sintomáticos, as queixas comuns incluem corrimento claro e escasso, disúria, ulceração peniana e prurido leve ou sensação de queimação imediatamente após a relação sexual (MALLA *et al.*, 2001, MACIEL *et al.*, 2004). No entanto, muitas vezes a presença de sintomas não permite a distinção clínica de outras causas de uretrite não gonocócica, sendo o *T. vaginalis* o responsável por 11% desses casos (PETRIN *et al.*, 1998).

1.2.3 Complicações clínicas

A tricomoníase não é apenas uma doença que traz incômodo às mulheres, ela é potencialmente perigosa podendo permanecer sem diagnóstico durante anos. Estudos recentes demonstram que as mulheres com tricomoníase têm maior suscetibilidade a apresentar problemas na gravidez, doença inflamatória pélvica e principalmente um risco aumentado de infecção pelo vírus do HIV (HUPPERT, 2009).

1.2.3.1 Problemas relacionados com a gravidez

Gestantes infectadas por *T. vaginalis* têm alto risco de desenvolver complicações durante a gravidez. Há relatos de associação entre tricomoníase e ruptura prematura de membrana, parto prematuro, baixo peso ao nascer, endometriose pós-parto, feto natimorto e morte neonatal (MACIEL *et al.*, 2004; HUPPERT, 2009). Estudo realizado em 2009 por Miranda e colaboradores em cinco macrorregiões brasileiras demonstrou que a taxa de tricomoníase entre as gestantes era de 7,7% (MIRANDA *et al.*, 2014). A tricomoníase, ou a resposta inflamatória do hospedeiro à infecção, pode reduzir a resistência biomecânica das membranas fetais e predispor as gestantes infectadas a sua ruptura prematura e consequentemente ao parto precoce (COLEMAN *et al.*, 2013).

O mecanismo dos fatores complicadores da gravidez ainda não é totalmente esclarecido, mas sabe-se que pode estar relacionado à resposta inflamatória inata materna (SILVER *et al.*, 2014). A presença e ativação de neutrófilos vaginais durante a gravidez têm sido associadas a complicações, incluindo infecção do fluido amniótico, nascimento prematuro e ruptura prematura de membranas. O pH vaginal elevado também parece estar associado à prematuridade (SIMHAN *et al.*, 2003; SIMHAN *et al.*, 2004) Em particular, interleucina 8 genital (IL-8), responsável por ativar neutrófilos, está presente em mulheres com tricomoníase, sintomáticas ou não, e desempenha um papel crítico no desencadeamento do amadurecimento cervical e na dilatação, através do recrutamento de neutrófilos para o tecido do colo uterino, resultando na liberação elevada de collagenases e elastases (SIMHAN *et al.*, 2007).

Silver e colaboradores, em um estudo de meta-análise, demonstraram que a tricomoníase está relacionada à partos prematuros em 42% dos casos, 41% com a ocorrência de ruptura prematura de membrana e em 51% dos casos onde se tem um tamanho reduzido do feto para a idade gestacional correspondente. Além disso, foi estabelecido um *odds ratio* de 1,27 para prematuridade, o que significa que a gestante positiva para *T. vaginalis* apresenta uma chance de 1,27 vezes maior de ocorrência de parto prematuro (SILVER *et al.*, 2014)

1.2.3.2 HIV

O *T. vaginalis* pode ter um papel crítico na amplificação da transmissão do HIV. A infecção é um importante cofator na propagação do vírus e causa grande impacto sobre a epidemia de HIV nas comunidades afro-americanas (MACIEL *et al.*, 2004). A prevalência de mulheres HIV positivas também infectadas por *T. vaginalis* varia de 6,1 a 52,5% enquanto que em mulheres HIV negativas essa prevalência passa a estar entre 3,2% a 34% (KISSINGER *et al.*, 2013). Um estudo conduzido no sul da África revelou que a tricomoníase estava presente em 29,5% de mulheres HIV positivas recebendo tratamento de antiretrovirais (KOCK *et al.*, 2011).

Entre os mecanismos que potencializam a susceptibilidade do hospedeiro ao vírus estão: o recrutamento de células alvo do HIV, células T CD4+ e macrófagos, para o trato genital como resultado da resposta imune do hospedeiro ao *T. vaginalis*, degradação dos fatores de proteção contra o HIV, tais como inibidores de protease leucocitária secretória e efeitos citotóxicos

diretos e indiretos do parasito (QUINLIVAN *et al.*, 2012). O *T. vaginalis* secreta também um fator que aumenta a descamação do epitélio, CDF, enfraquecendo assim a integridade estrutural e barreira de defesa contra a invasão pelo HIV. A tricomoníase pode provocar também micro-hemorragias no tecido da mucosa do trato genital, servindo como porta de entrada para o vírus (COLEMAN *et al.*, 2013). Similarmente, em uma pessoa infectada pelo HIV, os pontos hemorrágicos e a inflamação podem aumentar os níveis de vírus nos fluidos corporais e os níveis de macrófagos infectados pelo HIV presentes na região genital. Isso resulta em um aumento no número de vírus livres e ligados aos leucócitos, expandindo a porta de saída do HIV. Desse modo, há uma probabilidade oito vezes maior de exposição e transmissão para parceiro sexual não infectado (MACIEL *et al.*, 2004). O número de partículas de HIV foi 19 vezes maior no sêmen de homens com uretrite associada a *T. vaginalis* e quatro vezes maior em mulheres com tricomoníase em comparação com homens e mulheres não infectados pelo parasito (WANG *et al.*, 2001; PRICE *et al.*, 2003).

Em um estudo de coorte prospectivo, Laga e colaboradores demonstraram que a infecção por *T. vaginalis* estava associada a um risco aumentado de 1,7 vezes para a infecção pelo HIV (LAGA *et al.*, 1994). Esse achado foi suportado por outro estudo de coorte em 2007, onde McClelland e colaboradores encontraram o valor de 1,5 vezes de chances de infecção por HIV em pacientes trichomonas positivo (McCLELLAND *et al.*, 2007).

Wang e colaboradores demonstraram que a tricomoníase tratada resultou em uma redução de 4,2 vezes na quantidade de vírus livre em secreções vaginais, mas não resultou na diminuição da quantidade de células infectadas pelo vírus do HIV. Em contraste, o tratamento de vaginose bacteriana não obteve o mesmo resultado, mantendo a carga viral e o número de células infectadas constantes (WANG *et al.*, 2001).

T. vaginalis parece ter também uma associação com o vírus do Herpes simples 2 (HSV-2) semelhante ao que acontece com o HIV, onde infecções simultâneas não são incomuns (KISSINGER, 2015).

1.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da tricomoníase não deve ser estabelecido baseando-se somente na apresentação clínica da doença, uma parcela significativa de indivíduos são assintomáticos e,

além disso, a infecção poderia ser confundida com outras DST's, visto que achados clássicos não estão presentes em todos pacientes. Se as manifestações clínicas fossem utilizadas isoladamente para o diagnóstico, 88% dos diagnósticos de mulheres seriam falso-negativos, enquanto que 29% seriam falso-positivos (PETRIN *et al.*, 1998). A investigação laboratorial é necessária e essencial para o diagnóstico uma vez que leva ao tratamento apropriado e facilita o controle da propagação da infecção (MALLA *et al.*, 2001; MACIEL *et al.*, 2004; FEITOSA & CONSOLARO, 2005). Dentre as metodologias de diagnóstico utilizadas para detecção da tricomoniase estão:

1.2.4.1 Microscopia

A análise microscópica é um método de diagnóstico tradicional que foi descrito em 1836 por Donné (PETRIN *et al.*, 1998). Ele é realizado a partir de amostra de corrimento vaginal e/ou de urina, onde estes são colocados em lâmina com salina e observados em microscópio eletrônico. A identificação do parasito baseia-se na observação de sua motilidade característica (MALLA *et al.*, 2001). Este método é menos dispendioso, uma vez que necessita apenas de um microscópio e experiência clínica, mas tem baixa sensibilidade (60% - 70%) (SCHWEBKE & BURGESS, 2004).

A preparação pode revelar células ovais ou arredondadas, células flageladas e muitos polimorfonucleares. Os trofozoítos de *T. vaginalis* podem ser semelhantes em tamanho e forma com as células brancas do sangue, por isso a observação de motilidade característica é necessária para a realização do diagnóstico. A baixa sensibilidade é atribuída à perda da motilidade após o parasito ser removido da temperatura corporal. Melhores resultados são obtidos quando esse tipo de exame é utilizado em pacientes sintomáticos e quando a amostra é examinada no prazo de até meia hora. No entanto, uma maior demora não é incomum na clínica, levando a preocupações a cerca da confiabilidade desse tipo de diagnóstico (MALLA *et al.*, 2001; BACHMANN *et al.*, 2011; COLEMAN *et al.*, 2013).

1.2.4.2 Cultura

O método de cultura é o “padrão ouro” para o diagnóstico da tricomoniase, pois além de apresentar uma interpretação simples, ele requer um número reduzido de trofozoítos (PETRIN *et al.*, 1998). Nas mulheres, a amostra de escolha para o cultivo deve ser as secreções

vaginais, pois a cultura de urina é menos eficiente para iniciar o desenvolvimento do parasito. Em homens, as culturas podem ser feitas a partir de amostras de urina, sêmen e uretra, embora amostras múltiplas também possam ser utilizadas para inoculação em uma cultura única com o objetivo de aumentar o seu rendimento. No entanto, mesmo em condições ideais, a cultura não é um método de diagnóstico sensível para homens (BACHMANN *et al.*, 2011).

O *T. vaginalis* apresenta um ótimo crescimento e reprodução e para isso não requer normalmente um grande número de nutrientes, onde dentre estes incluem: carboidratos, aminoácidos, purinas, pirimidinas, ácidos graxos, vitamina e ferro. O meio Diamond é considerado o padrão ouro para a técnica que é amplamente utilizada (SOOD *et al.*, 2007).

Uma vez inoculadas, as culturas são incubadas e podem necessitar de 2 a 7 dias para sua identificação, tempo suficiente para que os pacientes infectados possam transmitir o parasito. O tempo requerido é, portanto, uma limitação desse método (MALLA *et al.*, 2001; BACHMANN *et al.*, 2011).

Para melhorar a aceitabilidade do diagnóstico por cultura, o método *InPouch*, disponível comercialmente, foi criado. Essencialmente esse método consiste no uso de uma bolsa de dupla câmara feita de material plástico que estão interligadas por um canal estreito. Este material permite a visualização imediata da amostra (equivalente ao método de análise microscópica) e a realização de cultura, permitindo a dupla análise em um único sistema (Figura 5) (BUNBURY *et al.*, 2005). Com o método *InPouch*, é possível realizar a leitura microscópica inicial da amostra e seu acompanhamento durante a inoculação sem a necessidade de amostragem diária, requerendo portanto, menos tempo para a análise (DRAPER *et al.*, 1993; PETRIN *et al.*, 1998; SCHWEBKE & BURGESS, 2004). Esse sistema pode ser considerado igualmente sensível ao método tradicional e é uma alternativa que traz comodidade e eficiência (LEVI *et al.*, 1997; BRAVO *et al.*, 2010). A sensibilidade e a especificidade do método de cultura é de, respectivamente, 75%–96%, e 100%, sendo bastante semelhante para o método *InPouch* (NYE *et al.*, 2009).



Figura 5- Método *InPouch* de diagnóstico de *T. vaginalis*

1.2.4.3 Colpocitopatologia – Papanicolaou

O diagnóstico citológico foi criado na década de 40 pelo Dr. George Papanicolaou e desde então tem sido amplamente aceito para reconhecer câncer cervical inicial, bem como melhorar a compreensão da resposta do hospedeiro às neoplasias e radiações. Além disso, tem crescido atualmente o interesse no uso dessa metodologia para o diagnóstico de algumas infecções cérvico-vaginais associadas à patógenos de DSTs, como a tricomoníase (FEITOSA & CONSOLARO, 2005).

A colpocitopatologia é um exame citológico onde o desenvolvimento de cor é o parâmetro básico para identificação de patologias. Ele é utilizado rotineiramente no rastreio ginecológico de anormalidades citológicas, particularmente em populações com alta prevalência de DST's. A técnica de coloração tem suas limitações, já que nem sempre o parasito buscado aparece em sua forma típica (piriforme) e suas características morfológicas, como flagelos, podem ser perdidos durante fixação e coloração (MALLA *et al.*, 2001).

O diagnóstico pela técnica de Papanicolaou se dá mediante a observação morfológica do próprio parasito e das manifestações celulares inflamatórias, juntamente à reação leucocitária por ele induzidas. As células geralmente podem apresentar alterações peculiares da infecção específica do parasito. No caso do *T. vaginalis*, essas alterações ocorrem tanto a nível nuclear quanto citoplasmática. Entretanto, a identificação do parasito é essencial para que o diagnóstico seja estabelecido com segurança, pois reação inflamatória pronunciada, binucleações, falsa eosinofilia, halo perinuclear, anfofilia, discreta, cariomegalia e

hipercromasia, podem assemelhar-se a uma lesão pré-cancerosa ou mesmo ao carcinoma *in situ* e representam, em conjunto, os chamados sinais citológicos indiretos da tricomoníase (FEITOSA & CONSOLARO, 2005).

O exame de Papanicolaou apresenta-se pouco sensível (36-60%) e menos específico (90%) quando comparado com o método de cultura (HUPERT, 2009). Em comparação ao método de PCR (reação em cadeia da polimerase), a especificidade do Papanicolaou foi de 97,6%, embora a sensibilidade tenha sido apenas de 60,7% (BRAVO *et al.*, 2010).

1.2.4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação da sequência de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo largamente utilizada no diagnóstico das doenças infecciosas e seu uso no diagnóstico da tricomoníase tem sido desenvolvido (BRAVO *et al.*, 2010). A utilização de métodos de PCR tem como vantagem a detecção de organismos não cultiváveis e também a capacidade de detectar as células e sequências alvo em amostras clínicas que tenham sido submetidos à fixação ou degradação parcial (PETRIN *et al.*, 1998). Um sítio de amplificação para *T. vaginalis* é a porção 16S do seu RNA ribossomal (HOLLMAN *et al.*, 2010).

Ao contrário da PCR para infecções como a gonorréia e clamídia, que parece ter maior sensibilidade do que os métodos de cultura, o diagnóstico por PCR para tricomoníase em mulheres parece não oferecer uma vantagem de diagnóstico (SCHWEBKE & BURGESS, 2004). Isto acontece porque o *T. vaginalis* é um organismo muito menos exigente para cultura em comparação com *Neisseria gonorrhoeae* ou *Chlamydia trachomatis* já que uma cultura bem sucedida de *T. vaginalis* requer apenas a multiplicação de um único organismo. PCR de esfregaços vaginais podem ser vantajosos em situações em que a incubação das culturas não seja possível e o transporte de amostras para um laboratório de referência seja necessário (SCHWEBKE & BURGESS, 2004).

O método de PCR pode ser mais interessante para o diagnóstico da tricomoníase em homens. Estudo conduzido por Schwebke e Lawing demonstrou sensibilidade de 100% pelo método de PCR em amostras masculinas, mas a especificidade encontrada foi menor quando comparado com o método de cultura (SCHWEBKE & LAWING, 2002). Estes resultados podem estar

relacionados à necessidade da cultura ter o parasita íntegro, vivo. Já na PCR, fragmentos de DNA amplificável são suficientes.

1.2.4.5 Detecção de antígenos

Há dois testes comercialmente disponíveis nos EUA para detecção de antígenos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*), ambos apresentando maior sensibilidade em comparação com teste parasitológico à fresco em pacientes sintomáticos (CAMPBELL *et al.*, 2008). O teste rápido de detecção de antígeno (OSOM TV; Genzyme Diagnostics, Cambridge, Massachusetts, EUA) foi desenvolvido em 2003. Este teste detecta proteínas de membrana de *T. vaginalis* a partir de uma imunocromatografia em cerca de 10 minutos. Se *T. vaginalis* estiver presente na amostra a ser testada ele irá formar um complexo com um anticorpo anti-trichomonas primário conjugado com um substrato de cor azul. O complexo será então ligado a um segundo anticorpo anti-trichomonas revestido de uma membrana de nitrocelulose. O aparecimento de uma linha visível azul juntamente com uma linha vermelha do controle é um indicativo de positividade (Figura 6) (OSOM TV®). A sua sensibilidade (94,7%) e especificidade (100%) são similares ao método de cultura (CAMPBELL *et al.*, 2008).

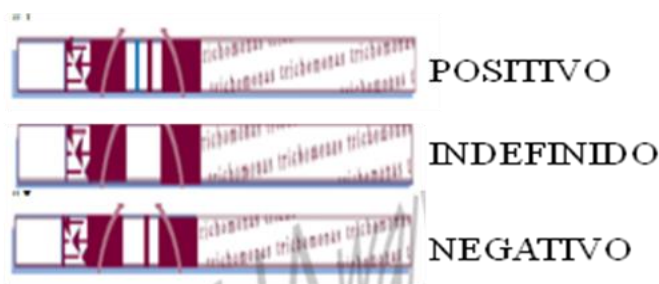


Figura 6- Teste rápido de detecção de antígeno de *T. vaginalis* (OSOM TV®).

Disponível em:

http://www.cliawaived.com/web/items/pdf/GZM_181_OSOM_Trichomonas_Training_Book~1260file3.pdf

Affirm VPIII (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) é um teste de hibridação de sonda de DNA desenvolvido para a diferenciação e identificação dos patógenos associados com vaginose bacteriana (*Gardnerella vaginalis*) e vaginite (*T. vaginalis* e espécies de *Candida*). Ele baseia-se nos princípios de hibridação de ácido nucléico e usa duas sondas distintas de

cadeia simples para cada organismo, uma sonda de captura e uma sonda de desenvolvimento da cor (Figura 7). Os resultados do Affirm VPIII são avaliados após 45 minutos. O teste apresenta sensibilidade e especificidade de 63% e 99,9% respectivamente quando comparado à cultura, observando-se uma maior sensibilidade para mulheres sintomáticas (BROWN *et al.*, 2004; ANDREA & CHAPIN, 2011).

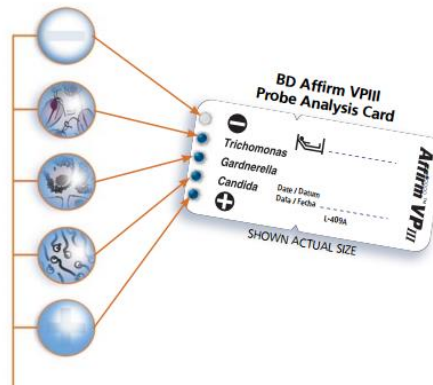


Figura 7- Teste de detecção de vaginose Affirm VPIII BD®

Disponível em: https://www.bd.com/ds/technicalCenter/brochures/br_5_2301.pdf

Em áreas com altas taxas de perda de acompanhamento, testes rápidos podem ser muito importantes para o controle da tricomoníase (HUPPERT, 2009; COLEMAN *et al.*, 2013). No entanto, nem o OSOM TV® nem o teste Afirmar VP III são aprovados pela FDA para uso com amostras obtidas de homens (CDC, 2015).

1 2.5 Tratamento

A associação de *T. vaginalis* com casos de vaginite foi determinada em 1916, 80 anos após a descoberta do parasito. No entanto, apenas 40 anos depois uma cura eficaz foi descoberta com o uso do Metronidazol (MTZ) (UPCROFT & UPCROFT, 2001). Os nitroimidazóis são a única classe de antimicrobianos eficazes contra infecções por *T. vaginalis*. Desta classe, apenas o MTZ e o Tinidazol (TNZ) são aprovados pelo FDA para o tratamento da tricomoníase (CDC, 2015). Casos de resistência ao tratamento vêm sendo relatados desde 1962, ocorrendo também resistências cruzadas entre os diferentes nitroimidazóis (UPCROFT & UPCROFT, 2001).

1.3 Nitroimidazóis

1.3.1. Metronidazol (MTZ)

O MTZ (1-β-hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazol) é um composto heterocíclico com um grupo nitro na posição cinco do anel imidazólico (Figura 8). Desenvolvido em 1959, originalmente indicado para o tratamento da infecção causada pelo *T. vaginalis*, foi o primeiro fármaco a ter uma taxa de cura de 100% com o tratamento sistêmico. O responsável pela atividade tricomonicida é o grupo 5-nitro que é reduzido a um nitro radical no parasito em ambientes com baixa concentração de oxigênio (CUDMORE *et al.*, 2004).

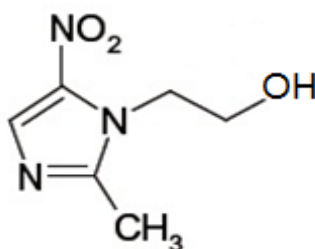


Figura 8- Fórmula estrutural do MTZ

MTZ é um importante fármaco utilizado também no tratamento de outras doenças causadas por protozoários anaeróbios como a amebíase (*Entamoeba histolytica*) e a giardíase (*Giardia lamblia*), e também contra bactérias anaeróbias, tais como *Bacteroides fragilis* e *Clostridium difficile* (GÓMEZ-ARROYO *et al.*, 2004; LOFMARK *et al.*, 2010).

O MTZ é um pró-fármaco bioprecursor, já que se trata de uma molécula inativa que requer ativação redutiva do grupo nitro para transformar-se em seu metabólito ativo (LOFMARK *et al.*, 2010). Essa ativação ocorre nos hidrogenossomos presentes no *T. vaginalis* e está relacionada à atividade da piruvato ferredoxina oxido-redutase (PFOR), envolvida no metabolismo de carboidrato de alguns microrganismos anaeróbios. Por não possuírem este tipo de metabolismo energético, organismos aeróbicos, como os dos humanos são refratários a ação direta do fármaco (BENCHIMOL, 2008).

A penetração celular do MTZ ocorre por difusão passiva. Os anaeróbios geram sua energia por meio da fermentação oxidativa do piruvato, catalisada pela enzima PFOR. Esse processo

libera elétrons que reduzem as ferredoxinas, pequenas proteínas Fe-S com potencial redox suficientemente negativo para doar elétrons ao MTZ. A ativação do fármaco ocorre quando um elétron é transferido para o grupo nitro, formando um nitro radical tóxico que leva à morte os organismos susceptíveis mediante ação sobre o DNA e possivelmente sobre outras biomoléculas vitais (Figura 9) (DUNNE *et al.*, 2003; CHUNG, 2005; LOFMARK *et al.*, 2010). Além da produção dos radicais tóxicos, a produção de hidrogênio molecular é diminuída na presença de MTZ, resultando em um aumento intracelular de peróxido de hidrogênio, que é também um poderoso agente oxidante (DUNNE *et al.*, 2003).

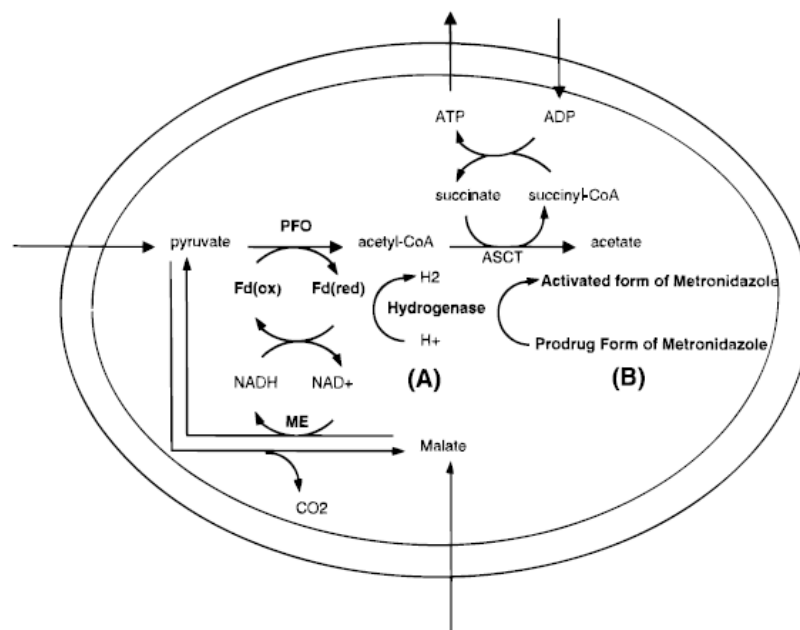


Figura 9- Metabolismo do piruvato e ativação do MTZ nos hidrogenossomos de *T. vaginalis*.

Piruvato é gerado por glicólise no citoplasma de trichomonas e em seguida entra nos hidrogenossomos. A oxidação do piruvato a acetil-CoA é catalisado por PFO e ASCT (acetato succinato CoA transferase). Fluxo de elétrons gerados a partir de descarboxilação do piruvato ocorre como indicado. Sob condições anaeróbicas, hidrogenase pode catalisar a formação de hidrogênio molecular através da redução de prótons H⁺ (A). MTZ compete por elétrons das ferredoxinas e tornar-se ativado quando um único elétron é transferido para o seu grupo nitro, formando um radical nitro livre (B). Esse radical livre é citotóxico para a célula do parasito (LAND *et al.*, 2001).

O uso do MTZ pode ser feito por via oral, intravenoso ou através do uso tópico. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) recomenda o uso de 2 g em dose única, via oral, ou como tratamento alternativo o uso oral de 500 mg duas vezes ao dia durante sete dias (CDC,

2015). O uso do gel de MTZ apresenta menor eficácia (< 50%) do que as preparações orais, pois este não atinge níveis terapêuticos locais, sendo por isso pouco recomendado (BRAVO *et al.*, 2010). O tratamento adequado com MTZ tem uma porcentagem de cura entre 60-80% dos casos com uma única dose, mas essa taxa pode aumentar para >90% quando os parceiros sexuais, que normalmente são assintomáticos, são tratados simultaneamente, evitando dessa forma casos de reinfecção (MAHDI, 2006).

O tratamento da tricomoníase durante a gravidez é um assunto que traz muitas dúvidas. O CDC recomenda o tratamento da tricomoníase sintomática a qualquer momento durante a gravidez com dose única de 2g de MTZ já que estudos recentes não demonstram associação entre o uso do MTZ e a ocorrência de eventos adversos como prematuridade, baixo peso ao nascer ou anomalias congênitas após o tratamento (MANN *et al.*, 2009; STRINGER *et al.*, 2010; KOSS *et al.*, 2012; CDC, 2015). O aleitamento materno após o uso do MTZ (2g em dose única) não trouxe nenhuma reação nos lactentes (GRAY *et al.*, 1961; LACTMED, 2015). No entanto, a academia americana de pediatria recomenda que seja dado um intervalo de 12 a 24 horas após a administração da dose única de MTZ para o aleitamento (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2001).

Muita atenção tem sido destinada aos relatos sobre um potencial carcinogênico devido ao fato de que o tratamento por longo período com altas doses de MTZ poderia induzir tumores nos pulmões de animais (CONNOR *et al.*, 1977). Porém, devido à realização de poucos estudos, não é possível considerar esse fármaco como um carcinógeno humano (CARO-PATÓN *et al.*, 1997; BENDESKY, 2002; MACIEL *et al.*, 2004).

A distribuição do MTZ é de 93-100% mediante uso oral, já que ele não se liga às proteínas séricas (GEHRIG & EFFERTH, 2009; HUPPERT, 2009). O tratamento com MTZ é geralmente bem tolerado, entretanto em alguns casos existem reações adversas, tais como náuseas, vômitos, dor de cabeça, tonturas, insônia, sonolência, erupção, boca seca e gosto metálico (os dois últimos sendo geralmente associado com MTZ oral apenas). Estes efeitos secundários são geralmente rápidos e dose dependente, embora alguns pacientes tenham reações graves o suficiente para não aderirem à terapia com MTZ (CUDMORE *et al.*, 2004). Reações adversas graves são raras, incluindo crises convulsivas e neuropatia periférica, caracterizada principalmente por dormência ou parestesia, que foram relatadas em pacientes que receberam tratamento prolongado com MTZ (LOFMARK *et al.*, 2010). Embora o

tratamento com MTZ seja relativamente barato e eficaz, existem barreiras significativas à redução da carga global de infecções por *T. vaginalis*, como os casos de resistência ao parasito onde se relata taxas de 2,5-9,6% (KIRKCALDY *et al.*, 2012).

1.3.2. Tinidazol (TNZ)

O TNZ, 1-[2-(etilsulfonil)etil]-2-metil-5-nitroimidazol, é um composto da segunda geração dos 5-nitroimidazóis, um análogo estrutural do MTZ (Figura 10). Ele tem sido amplamente utilizado por toda a Europa e em países em desenvolvimento para o tratamento de parasitoses desde a sua introdução em 1969. No entanto, seu uso só foi aprovado pelo FDA para o tratamento da tricomoníase, giardíase, amebíase e abscesso hepático amebiano em 2004. Similarmente ao MTZ, o TNZ também apresenta atividade contra bactérias anaeróbicas (FUNG & DOAN *et al.*, 2005).

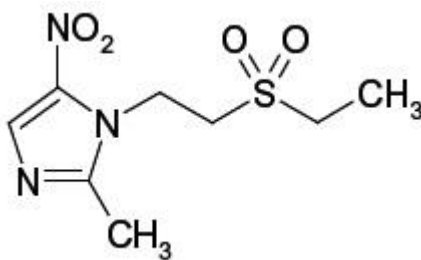


Figura 10- Fórmula estrutural Tinidazol

A meia vida de eliminação do TNZ é aproximadamente duas vezes maior que o do MTZ, 12-14 h e 6 -7 h respectivamente (SOPER *et al.*, 2001). Tal como acontece com outros 5-nitroimidazóis, o TNZ é essencialmente um pró-fármaco que deve a sua ação a uma reação de redução responsável por convertê-lo a sua forma citotóxica (FUNG & DOAN *et al.*, 2005).

O regime de tratamento recomendado para o TNZ é igual para o MTZ, dose única oral de 2 g (CDC, 2015). Em geral, o TNZ apresenta uma atividade 1,8 vezes maior que o MTZ (FUNG & DOAN *et al.*, 2005). Estudos indicam que o aumento da resistência ao MTZ está correlacionado com o aumento da resistência ao TNZ, embora as concentrações tricomoníadas para a última substância ainda possam ser menores em alguns casos (NARCISI & SECOR, 1996; CROWELL *et al.*, 2003; SCHWEBKE & BARRIENTES *et al.*, 2006).

Os efeitos adversos ao TNZ, no geral, são bastante semelhantes aos do MTZ, no entanto, o TNZ parece ser mais bem tolerado (FUNG & DOAN *et al.*, 2005). É importante ressaltar que o consumo de álcool deve ser evitado durante o tratamento com nitroimidazóis para reduzir a possibilidade de uma reação do tipo dissulfiram. Isto porque essas substâncias inibem a aldeído desidrogenase, levando a um acúmulo de acetaldeído após a ingestão de álcool podendo ocorrer palpitações, taquicardia, náuseas e vômitos (SIMMS-CENDAN, 1996). No caso do TNZ, a abstinência ao álcool deve se estender até 72 horas após a conclusão do tratamento, enquanto para o MTZ esse tempo poderá ser de apenas 24 h. Essa diferença se deve ao tempo de meia vida mais longo do TNZ (CDC, 2015).

Estudos envolvendo seres humanos e o uso de TNZ na gravidez são limitados. Contudo, os dados em animais sugerem que este fármaco apresenta um risco moderado e, portanto, seu uso deve ser evitado em mulheres grávidas e o aleitamento adiado por 72 horas após administração de dose única de 2 g (EVALDSON *et al.*, 1985; LACTMED, 2015).

1.4 Resistência

O MTZ é o fármaco de escolha para o tratamento da tricomoníase desde o início da década de 60. A resistência clínica ao MTZ é definida como a incapacidade de cura da infecção depois de pelo menos dois cursos consecutivos de tratamento (NARCISI & SECOR, 1996). A falha no tratamento tem sido atribuída a várias causas, como por exemplo: baixa absorção do fármaco, sua inativação pela microbiota vaginal, não cumprimento da terapia indicada e a ocorrência de reinfecções (RAMOS *et al.*, 2011). A família dos 5-nitroimidazóis, especificamente MTZ e TNZ, é a única classe de medicamentos aprovada para o tratamento da tricomoníase (DUNNE *et al.*, 2003).

As taxas de resistência do *T. vaginalis* ao MTZ podem ultrapassar os 10%, enquanto que a taxa para o TNZ é ainda menor que 1% (SCHWEBKE & BARRIENTES *et al.*, 2006). Na ausência de alternativas para o tratamento, a cura pode ser conseguida apenas por adoção de doses crescentes de MTZ. No entanto, altas doses do medicamento podem levar a uma potencialização de seus efeitos adversos, tornando-os intoleráveis a grande parte dos pacientes. Como consequência tem-se a redução da adesão ao tratamento ou mesmo a sua suspensão, levando a cronicidade da infecção bem como sua contínua transmissão (CUDMORE & GARBER, 2010).

A resistência de *T. vaginalis* ao MTZ é classificada como aeróbia e anaeróbia. Na resistência aeróbica, vias de remoção de oxigênio estão envolvidos. Estas vias não estão implicadas na resistência anaeróbia, a qual é conduzida através da redução ou interrupção da atividade da enzima piruvato: ferredoxina oxidoreductase (PFOR), ferredoxina e hidrogenases (CUDMORE *et al.*, 2004).

A resistência aeróbia representa a primeira fase do desenvolvimento da resistência, comumente observada *in vivo* através da aplicação de níveis terapêuticos do fármaco. Caracteriza-se por uma diminuição no processo de remoção do oxigênio, na manutenção da anaerobiose. Isto resulta em um aumento na concentração de oxigênio no interior do parasito prejudicando o baixo potencial necessário para a ativação do MTZ (GEHRIG & EFFERTH, 2009). Assim o oxigênio impede a ativação do MTZ, competindo com o MTZ por elétrons.

Na resistência anaeróbia o *T. vaginalis* perde a capacidade de ativar o MTZ devido a uma diminuição ou interrupção da atividade da PFOR, essencial para o metabolismo do fármaco e da ferredoxina, esta última devido à redução da transcrição gênica. O fato de que o PFOR e a ferredoxina não estarem completamente ausentes pode explicar porque infecções com tais cepas habitualmente respondem a doses mais altas de MTZ ou ao tratamento mais prolongado. A redução da atividade da hidrogenase pode levar a diminuição da produção de hidrogênio molecular pelo hidrogenossoma, resultando em formação de peróxido de hidrogênio e consequentemente de radical hidroxila que é altamente reativo com sistemas biológicos. O radical hidroxila pode levar a modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA, inativação de várias proteínas (enzimas e membrana celular) ao oxidar seus grupos sulfidrilas a pontes dissulfeto e também a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados de membranas celulares (lipoperoxidação) (CUDMORE *et al.*, 2004; GEHRIG & EFFERTH, 2009).

Resistência anaeróbica é desenvolvida principalmente em laboratório, no entanto ela pode ser observada também a partir da colonização no hospedeiro. Além disso, pode ser observada a progressão de uma resistência aeróbica para uma anaeróbica, sinalizando para a possível existência de mais de uma rota para a geração da resistência (UPCROFT & UPCROFT, 2001).

Orientações do CDC para pacientes que não respondem ao tratamento recomendado, onde é excluído a possibilidade de reinfecção, é o aumento da dose do fármaco, seguindo o esquema de dosagem de 500 mg, duas vezes ao dia, durante 7 dias (dose total, 7 g). Se esse tratamento falhar, deve-se adotar o esquema com MTZ ou TNZ 2 g durante 7 dias. Se vários esquemas semanais falharem em um paciente onde não se tenha problemas de não-adesão ao tratamento ou reinfecção, o teste de susceptibilidade do organismo para MTZ e TNZ é recomendado (CDC, 2015).

O fator limitante na maioria dos pacientes é a tolerância gastrointestinal ao uso de MTZ oral, particularmente náusea. Em raros casos, os investigadores recorreram à alta dose intravenosa de MTZ, que pode estar associado a convulsões e encefalopatia. Terapias prolongadas com MTZ podem também estar associadas a outras importantes complicações, incluindo pancreatite, neutropenia e neuropatia periférica (NARCISI & SECOR, 1996; SOBEL *et al.*, 2001).

Dentro deste cenário, o isolamento e desenvolvimento de novas substâncias dotadas de melhor atividade e baixa toxicidade, visando aumentar o arsenal terapêutico e superar o surgimento de cepas resistentes é uma atividade prioritária.

2 JUSTIFICATIVA

T. vaginalis é considerado um dos principais patógenos do trato geniturinário humano, sendo o agente etiológico da DST curável mais comum no mundo, a tricomoníase. Ela ocupa o terceiro lugar dentre as DST's mais prevalentes nos EUA, perdendo apenas para os vírus do papiloma humano e do herpes (ZIMMERMMANN *et al.*, 2008; KISSINGER *et al.*, 2009; CUDMORE & GARBER; 2010; CDC 2013). O custo médico estimado com a tricomoníase nos EUA em 2008 foi de US\$ 24,0 milhões (OWUSU-EDUSEI *et al.*, 2013).

Apesar de ser considerada uma doença de alta prevalência e de ampla distribuição geográfica, dados quantitativos são ainda considerados subestimados uma vez que a tricomoníase é uma doença sem notificação obrigatória e, além disso, estudos sugerem que aproximadamente 50 a 70% de indivíduos parasitados apresentam uma infecção subclínica (SORVILLO, 2001).

A tricomoníase é uma doença negligenciada que não apresenta programa de controle ativo. Suas complicações não estão relacionadas apenas ao desconforto causado por seus sinais e sintomas, mas principalmente com graves complicações de saúde como o maior risco de infecção pelo HIV, baixo peso em bebês, nascimentos prematuros, doença inflamatória pélvica atípica, neoplasia cervical e infertilidade (HUPPERT, 2009; ALVES, 2011).

Comumente associada a outras DST's, incluindo clamídia, gonorréia, sífilis e herpes tipo II, a tricomoníase tem sido avaliada como um marcador sensível de comportamento sexual de alto risco. Estudos recentes sugerem que a infecção por *T. vaginalis* pode ser um cofator importante para a transmissão e aquisição do vírus da imunodeficiência humana, uma vez que 24% das infecções por HIV estão diretamente relacionadas à tricomoníase (MUNDODI *et al.*, 2004; BACHMANN *et al.*, 2011).

O MTZ é o fármaco de escolha para o tratamento da tricomoníase desde o início da década de 60 e está presente na lista de medicamentos essenciais da OMS, sendo um dos antimicrobianos mais comumente utilizados na prática clínica atualmente (ALAWADI *et al.*, 2015). O seu amplo uso é justificado por sua segurança, baixo custo, amplo espectro de ação, farmacocinética e farmacodinâmica favoráveis (UPCROFT & UPCROFT, 2001; RABIEE *et al.*, 2012). No entanto, sua larga utilização favorece o surgimento de cepas resistentes, o que

vem acontecendo desde 1962. Estima-se que nos EUA, até 10% das infecções já não respondem ao tratamento convencional e em parte da África esses valores podem exceder os 15 % (SNIPES *et al.*, 2000; DUNNE *et al.*, 2003; SCHWEBKE *et al.*, 2006; KIRKCALDY *et al.*, 2012; LEITSCH *et al.*, 2015). Apesar disso, a família dos 5-nitroimidazóis, especificamente MTZ e o TNZ, é até hoje a única classe de medicamentos aprovada para o tratamento da tricomoníase (DUNNE *et al.*, 2003).

Orientações do CDC para pacientes que não respondem ao tratamento recomendado é o aumento da dose do fármaco com adoção de tratamentos mais longos, potencializando assim seus efeitos adversos. O aumento no desconforto durante o uso do medicamento faz com que a adesão do paciente ao tratamento fique comprometida, culminando, conseqüentemente, em complicações clínicas e na continuação da transmissão do parasito.

As peculiaridades acima mencionadas sinalizam a importância da pesquisa de novos fármacos tricomonicidas que apresentem como características principais segurança, boa atividade, poucos ou nenhum efeito adverso ao paciente, além de constituir tratamento alternativo para casos resistentes ao tratamento atual. A molécula de MTZ é bastante atrativa para a produção de novas moléculas dele derivadas devido à facilidade de manipulação de suas cadeias laterais, e pelo fato de ser um fármaco seguro e já bem estabelecido no mercado mundial (BUSATTI *et al.*, 2007). Sendo assim, novas substâncias derivadas do MTZ podem trazer grandes benefícios aos desafios atuais de resistência parasitária, fazendo-se necessário o seu estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade tricomonicida do derivado clorado do MTZ (MTZ-Cl) sobre as cepas JT e CDC 085, sensível e resistente ao MTZ, respectivamente.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar inóculo para cada uma das cepas, JT e CDC 085;
- Estabelecer a CI_{50} do MTZ para cada uma das cepas, JT e CDC 085;
- Estabelecer a CI_{50} do MTZ-Cl para cada uma das cepas, JT e CDC 085;
- Avaliar o impacto da concentração das drogas no percentual de inibição dos trofozoítos
- Avaliar a citotoxicidade do composto MTZ-Cl em célula hepática;
- Realizar teste de toxicidade aguda *in vivo* para MTZ e MTZ-Cl;
- Avaliar a intensidade de liberação de espécies reativas de oxigênio entre as células de *T. vaginalis* tratadas com MTZ e MTZ-Cl.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas de *T. vaginalis*

Foram utilizadas durante os testes duas cepas de *T. vaginalis*, a cepa JT, originária do Rio de Janeiro - Brasil, isolada em 1979 de uma paciente do sexo feminino, 40 anos, sintomática, e a cepa CDC 085 (ATCC 50143) conhecidamente resistente ao MTZ, isolada de humano em Columbus, Ohio, em 1980. As cepas foram mantidas no Laboratório de Amebíases nas dependências da Universidade Federal de Minas Gerais, em cultivo axênico.

4.2 Manutenção do parasito

Os trofozoítos foram cultivados em tubos de vidro (Pyrex®) contendo 13 mL de meio YI-S-32 (CLARK & DIAMOND, 2002) e incubados em estufa bacteriológica a 37°C. As culturas foram observadas em microscópio invertido onde foram avaliados crescimento e aderência à parede do tubo. Aqueles em fase logarítmica de crescimento sofreram subcultivos, onde para isso uma alíquota foi transferida para um novo tubo contendo meio de cultura fresco. Para facilitar o desprendimento dos parasitos do tubo, estes foram mantidos no gelo por vinte minutos e homogeneizados manualmente. Após o subcultivo, as culturas foram mantidas novamente em estufa bacteriológica a 37°C. Repiques entre 48 e 72 horas garantiram a utilização dos parasitos em fase exponencial de crescimento.

4.3 Síntese do MTZ-Cl

A síntese do derivado MTZ-Cl (1-(2-cloroetil)-2-metil-5-nitro-1H-imidazol) foi realizada sob coordenação do Professor Ricardo José Alves do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG, a partir do produto MTZ (Sigma, EUA). Para seu preparo, o MTZ foi dissolvido em cloreto de tionila (SOCl₂) e a solução aquecida a 70°C durante 6 horas, sendo posteriormente resfriada (Figura 11). Em seguida, o excesso de SOCl₂ foi removido em rota-evaporador. A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada de sílica. A avaliação da pureza dos compostos foi feita pela determinação de sua faixa de fusa, pela comparação com amostras puras dos produtos por cromatografia em camada delgada de sílica, análise em infravermelho e RMN (ressonância

magnética nuclear) (LI *et al.*, 2008). As massas moleculares do MTZ e seu análogo clorado (MTZ-Cl) estão descrito na tabela 1.

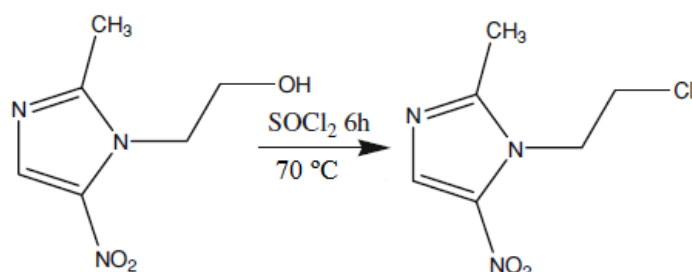


Figura 11- Esquema de síntese do MTZ-Cl

Tabela 1- Massa molar do MTZ e do MTZ-Cl

Tabela 1- Nenhuma bstância	Massa molar (g/mol)
MTZ	171,14
MTZ-Cl	189,65

4.4 Padronização do inóculo

Para a padronização dos inóculos das cepas JT e CDC 085 utilizadas nos testes de inibição *in vitro*, foram estabelecidas para cada uma delas a concentração de trofozoítos que propiciou a formação de crescimento celular em monocamada, com células alongadas, boa vitalidade e ausência de precipitado após 48 h de incubação em estufa a 37°C. Os testes foram feitos em triplicata e foram utilizados parasitos em fase logarítmica de crescimento. Para o desprendimento dos trofozoítos, que tem como característica o crescimento em aderência à parede do tubo de cultivo, estes foram mantidos no gelo por 20 minutos e posteriormente sofreram agitação mecânica. A quantificação do inóculo foi realizada a partir da técnica de contagem de leucócitos adaptada em Câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (Nikon Eclipse E100) (CARVALHO & SILVA, 1988). Foi utilizado o aumento de 10X e eosina como corante vital. Resumidamente, 40 µL da suspensão de trofozoítos foram transferidas para “eppendorfs” contendo 160 µL de solução de eosina a 0,125%. Após homogeneização, uma alíquota desse conteúdo foi depositada sob os retículos da câmara de Neubauer, evitando o excesso de líquido e bolhas de ar. A câmara foi levada ao microscópio,

focalizada e realizada a contagem dos parasitos. O cálculo do número de trofozoítos/mL foi estabelecido empregando-se a seguinte equação:

$$Z = Fc \times Fd \times Y$$

Onde:

Z = número de trofozoítos por mililitro (mL) de suspensão;

Fc = fator de correção da Câmara de Neubauer (2.500);

Fd = fator de diluição utilizado durante a contagem;

Y = número de trofozoítos contados nos quatro quadrantes laterais da câmara.

Para a escolha do inóculo ideal, diferentes concentrações de trofozoítos, em triplicata, foram avaliadas (40.000, 60.000 e 80.000 trofozoítos por tubo, cada um contendo um volume final de 6 mL).

4.5 Preparo das soluções

4.5.1 Solução para teste com MTZ e a cepa JT

O MTZ foi dissolvido em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Obteve-se solução de concentração de 6×10^{-2} mg/mL. Alíquota de 12 µL da solução de MTZ foi adicionada a 5 mL de meio de cultura chegando a uma concentração final de $3,5 \times 10^{-4}$ mol/L. A solução preparada foi filtrada em membrana esterilizante de nitrocelulose de 0,2 µm e alíquotas em volumes crescentes de 1,71 a 54,72 µL foram adicionadas aos tubos de vidro contendo os trofozoítos em culturas axênicas.

4.5.2 Solução para teste com MTZ-Cl e a cepa JT

O MTZ-Cl foi dissolvido em 900 µL de DMSO. Obteve-se soluções de concentração entre $9,4 \times 10^{-3}$ a $9,8 \times 10^{-3}$ mg/mL. Alíquotas de 10 µL das soluções de MTZ-Cl foram adicionadas a 13 mL de meio de cultura e filtrada em membrana esterilizante. Alíquotas no intervalo entre 1,16 a 38,4 µL foram adicionadas aos tubos de vidro contendo trofozoítos.

4.5.3 Solução para teste com MTZ e a cepa CDC 085

O MTZ foi dissolvido em 1000 µL de DMSO. Obteve-se soluções de concentrações de 0,08 mg/mL. Alíquota de 100 µL da solução de MTZ foi adicionada a 13 mL de meio de cultura chegando a uma concentração final de $4,67 \times 10^{-4}$ mol/L. As soluções preparadas foram filtradas em membrana esterilizante de nitrocelulose de 0,2 µm e alíquotas em volumes crescentes de 3,85 a 123 µL foram adicionadas aos tubos de vidro contendo os trofozoítos em culturas axênicas.

4.5.4 Solução para teste com MTZ-Cl e a cepa CDC 085

O MTZ-Cl foi dissolvido em 1000 µL de DMSO. Obteve-se uma solução de concentração igual a 0,036 mg/mL. Alíquota de 100 µL da solução de MTZ foi adicionada a 13 mL de meio de cultura chegando a uma concentração final de $1,9 \times 10^{-4}$ mol/L. As soluções preparadas foram filtradas em membrana esterilizante de nitrocelulose de 0,2 µm e alíquotas em volumes crescentes de 6,31 a 201,9 µL foram adicionadas aos tubos de vidro contendo os trofozoítos em culturas axênicas.

4.6 Ensaios de inibição *in vitro*

O efeito do MTZ-Cl sobre o crescimento dos trofozoítos de *T. vaginalis* foi avaliado *in vitro* por comparação com controles negativos (inóculo e meio de cultura) e controles positivos (MTZ). Todos os ensaios foram realizados separadamente, em triplicata e repetidos pelo menos duas vezes.

Durante os ensaios de inibição, $4,0 \times 10^4$ trofozoítos de *T. vaginalis*, cepa JT e CDC 085, em fase logarítmica de crescimento, foram distribuídos em tubos de vidro (Pyrex ® 13x100 mm) contendo meio YI-S-32, para um volume final de 6 mL.

O MTZ, em solução estéril, foi adicionado a cultura para obtenção de concentrações finais variando de 0,1 a 3,2 µM para teste com a cepa JT, e 0,3 a 9,6 µM para testes com a cepa CDC 085. Da mesma forma, o análogo MTZ-Cl foi adicionado à cultura a fim de obter concentrações finais variando de 0,01 a 0,32 µM para testes com a cepa JT e de 0,2 a 6,4 µM para testes realizados com a cepa CDC 085.

Todos os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C durante intervalos de 24h e 48h. Após cada intervalo de incubação, a viabilidade foi verificada qualitativamente através de observação em microscópio invertido, de acordo com a aderência dos trofozoítos. Para determinação da CI_{50} (concentração necessária para inibir 50% do crescimento do parasito) a quantificação dos trofozoítos viáveis se fez através da técnica de contagem de leucócitos adaptada detalhada anteriormente no item 4.4. A inibição do crescimento *in vitro* foi expressa em porcentagem.

4.7 Análise estatística

Na avaliação dos ensaios *in vitro* foram utilizadas técnicas de análise descritiva, como gráficos de dispersão, para demonstrar a linha de tendência da relação entre a concentração das substâncias testes e o percentual de inibição do protozoário *T. vaginalis*. A técnica de análise de regressão linear simples (WERKEMA & AGUIAR, 2006) foi utilizada para estimar a relação entre a concentração e o percentual de inibição. A variável resposta ou dependente foi o percentual de inibição do crescimento e a variável independente ou explicativa foi a concentração.

Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para identificar a significância do modelo de regressão obtido, ou seja, avaliar se a concentração influencia de forma significativa a inibição do crescimento do parasito. Para validação e posterior utilização da equação de regressão proposta, realizou-se a análise de resíduos e *outliers*. A qualidade de ajuste do modelo foi avaliada através do Coeficiente de Determinação Ajustado (R^2 aj.), através do qual se demonstra a proporção da variabilidade de inibição explicada pela concentração da substância testada.

A partir da relação obtida, estimou-se a CI_{50} , bem como seu intervalo de confiança, através da técnica de regressão inversa ou calibração (WERKEMA & AGUIAR, 2006). Para determinar a margem de erro utilizou-se o intervalo de confiança estimado para o CI_{50} , obtido através da técnica de regressão inversa, considerando-se uma confiança de 95% e de 90%. O *Software* utilizado foi o *Minitab 15*, ferramenta de Análise de Regressão Linear.

4.8 Avaliação de citotoxicidade

Para ser aprovado em um teste de citotoxicidade, um produto ou substância química não deverá causar a morte de células humanas nem afetar suas funções celulares. A metodologia adotada foi de acordo com o protocolo da Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD 129 (OECD, 2010) e do Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (ECVAM - 17). Durante o procedimento, foram utilizadas culturas de células hepáticas SK-Hep, cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com soro bovino fetal a 10%. As células hepáticas em crescimento exponencial (10^4 células / poço) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e incubadas na presença e ausência do MTZ-Cl em oito diferentes concentrações: 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 e 25,6 (μM), durante 48 horas. Após a incubação, foram adicionados 10 μL de uma solução de MTT [brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5 difeniltetrazólio] e a placa foi novamente incubada durante 3 horas. No final da incubação, todo o meio de cultura foi removido e substituído por 100 μL de DMSO e a placa agitada durante 5 minutos.

Os parâmetros de avaliação observados foram a porcentagem de morte celular. O MTT, em contato com as células, é reduzido em uma reação mitocondrial formando um produto formazan. O produto acumula na célula já que não consegue atravessar a membrana plasmática. Na solubilização das células o formazan é liberado, produzindo alteração na coloração. Essa coloração pode ser analisada e detectada por espectrofotômetro, no comprimento de onda 570 nm. O resultado foi expresso como porcentagem de células viáveis e foi calculado como: (absorvância de células tratadas) / (absorvância das células de controle) x 100.

4.9 Avaliação de toxicidade oral aguda

Toxicidade oral aguda refere-se aos efeitos adversos que ocorrem após a administração oral de uma dose única de uma substância ou de várias doses num prazo de 24 horas.

O teste foi realizado de acordo com o protocolo da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD) 423 com a colaboração dos Profs. Carlos Tagliati e Geovanni Cassali, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e da Faculdade de Farmácia, respectivamente, ambos da UFMG. Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas, de

aproximadamente 12 semanas de idade, com peso inicial de $200 \text{ g} \pm 20\%$, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. O teste foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA-UFMG protocolo nº. 239/2015). A distribuição dos animais foi de forma aleatória em quatro grupos contendo três animais cada. Estes animais foram acomodados em gaiolas metálicas em sala experimental com temperatura controlada entre $23 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12 h. Água filtrada e ração disponível *ad libitum* exceto por um período de jejum (somente de ração) de 12 h que antecederam a administração oral e por um período de 4 h após este procedimento.

Todas as administrações foram feitas oralmente, em dose única, pelo método de gavagem. O primeiro grupo, composto de animais controle, recebeu apenas tampão fosfato (PBS); o segundo grupo, grupo controle-solvente, recebeu uma base para suspensões de nome comercial Polvix® (Galena, Brasil), com composição a base de sorbitol, celulose microcristalina, CMC, lauril sulfato de sódio e metil parabeno. Polvix foi o solvente utilizado para a dissolução do MTZ e MTZ-Cl, a partir de uma solução estoque de 500mg/mL ; no terceiro grupo administraram-se MTZ e no quarto grupo MTZ-Cl na concentração de 300 mg/Kg . Na ausência de mortes entre os animais durante o experimento, o teste foi repetido, sendo realizado da mesma forma que o anterior aumentando apenas a concentração do MTZ e MTZ-Cl para 2000 mg/Kg conforme o fluxograma apresentado no protocolo (Figura 12).

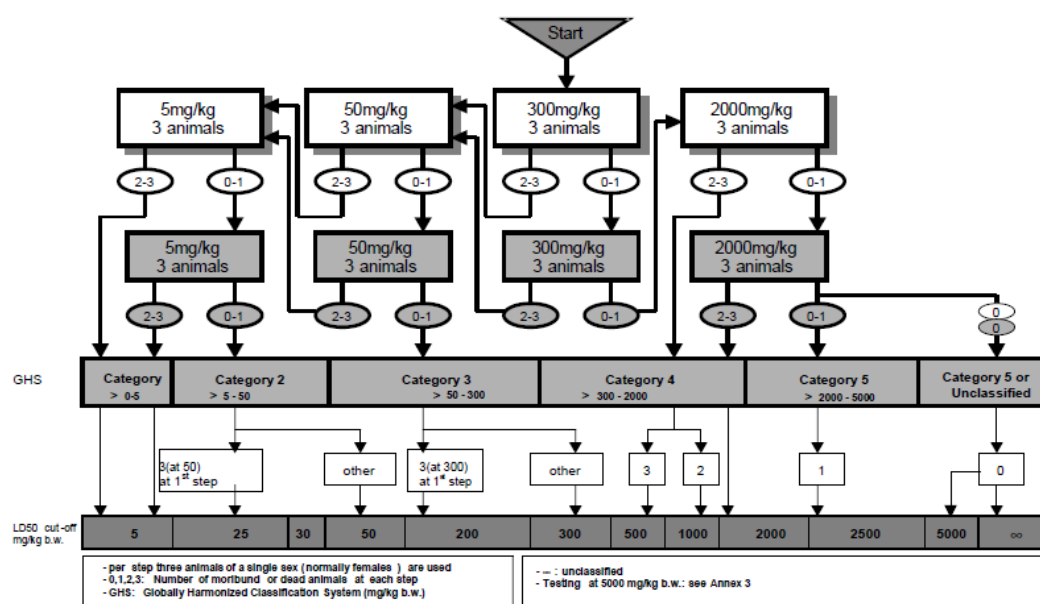


Figura 12- Fluxograma de teste de toxicidade aguda com dose inicial de 300mg/Kg (OECD 423)

Os animais foram observados cuidadosamente nos primeiros 30 minutos, mantendo-se especial atenção nas primeiras 4 horas, e de hora em hora até completar 8 horas após a administração. Após esse período, os animais foram avaliados por 14 dias, uma vez ao dia. Durante os 14 dias, avaliaram-se os seguintes parâmetros: locomoção, comportamento, respiração, alterações na pele e pêlos, olhos, tremores, salivação, diarreia, letargia, sonolência, número de mortes e a forma de sua ocorrência.

A eutanásia ocorreu no 15º dia por deslocamento cervical e posteriormente foi realizado procedimento de necropsia, somente no grupo que recebeu as substâncias na concentração de 2000mg/Kg, onde foram retirados os seguintes órgãos: coração, fígado, pulmão, rim e cérebro. Estes foram pesados e examinados macroscopicamente quanto à presença de áreas sugestivas de alterações. Os tecidos foram fixados em solução de formol a 10% tamponado, processados e incluídos em parafina. Secções histológicas de 4µm foram coradas em hematoxilina e eosina (HE) e utilizadas para a análise histopatológica.

4.10 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

O experimento de detecção de espécies reativas de oxigênio foi realizado com a colaboração do professor Luciano Capettini do departamento de farmacologia do ICB-UFMG. A metodologia utilizada foi a de fluorescência, com uso de sonda DHE (*Dihydroethidium*) que é capaz de detectar a produção de superóxido (O_2^-). O experimento foi realizado em placa de 24 poços, onde foi avaliado trofozoítos de *T. vaginalis* associados com MTZ e MTZ-Cl. Os experimentos foram feitos em duplicata.

4.10.1 Preparo da placa

Para facilitar a adesão do parasito à placa, foi utilizada lamínula gelatinizada. Para o processo de gelatinização, as lamínulas de vidro foram colocadas nos poços e onde foi adicionado 200 µL de gelatina de porco (Sigma-Aldrich®), a 0,1 %. A placa foi então incubada por 15 minutos em estufa bacteriológica. Após esse tempo, com a ajuda de uma pipeta, foi retirado o excesso de gelatina de cada um dos poços e a placa foi novamente incubada em estufa por mais 10 minutos.

4.10.2 Preparo dos parasitos

Após o processo de gelatinização da placa, *T. vaginalis* da cepa JT em fase exponencial de crescimento foi adicionado (40.000 trofozoítos/poço) e incubado em estufa de CO₂. Para garantir a aderência do parasito, manteve-se a placa em estufa de CO₂ por 2 horas antes de serem adicionados MTZ e MTZ-Cl.

4.10.3 Preparo das soluções

Após o tempo de incubação do parasito, eles foram associados ao MTZ e ao MTZ-Cl. Para o preparo da solução de MTZ, 3,6 mg de MTZ foi dissolvido em 1.500 µL de DMSO. Uma alíquota de 40 µL foi adicionada à 13 mL de meio de cultura obtendo uma solução de concentração de $7,38 \times 10^{-3}$ mg/mL. Já para o preparo da solução de MTZ-Cl, foi dissolvido 2,9 mg de MTZ-Cl em 1.000 µL de DMSO. Uma alíquota também de 40 µL foi adicionada à 13 mL de meio de cultura chegando a uma solução de concentração de $8,92 \times 10^{-3}$ mg/mL. As soluções foram filtradas em membrana esterilizante de nitrocelulose de 0,2 µm.

As concentrações de MTZ utilizadas foram de 0,027 µM [valor de CI₅₀ do MTZ-Cl (24 h)] e 0,229 µM [valor de CI₅₀ do MTZ (24 h)] . Já a concentração de MTZ-Cl utilizada foi de 0,027 µM [valor de CI₅₀ do MTZ-Cl (24 h)]. O poço controle recebeu apenas meio de cultura. O volume final dos poços foi de 2 mL ajustados com meio de cultura. Após a associação com as substâncias teste a placa foi incubada por 24 horas em estufa de CO₂.

4.10.4 Microscopia de fluorescência

Para avaliação da liberação de espécies reativas de oxigênio pelo parasito foi investigada a produção de superóxido (O₂⁻) com o uso da sonda de fluorescência DHE (Invitrogen, USA). O DHE tem a capacidade de permear livremente as membranas celulares, e é extensamente utilizado na monitorização da produção de superóxido (KIM *et al.*, 2016). A oxidação do DHE por O₂⁻ forma o composto fluorescente vermelho, 2-hydroxyethidium.

A placa previamente incubada por 24 horas recebeu a sonda DHE. Para isso foi retirado o meio de cultura presente na placa e prosseguiu-se com lavagem com PBS, em temperatura ambiente. Foi adicionado paraformaldeído 4% na quantidade o suficiente para cobrir a lamínula. Após 10 minutos, foi lavado novamente com PBS por três vezes. Acrescentou-se 50

μL de DHE ($5\ \mu\text{M}$) em cada poço e a placa foi incubada em estufa por 30 minutos. Foi realizada mais uma lavagem com PBS. As lamínulas foram montadas em lâmina utilizando base incolor nas suas extremidades para fixação.

A fluorescência foi detectada em 568 nm em microscópio confocal Zeiss 510 META, com objetiva de imersão em água de 63x de aumento. Os resultados foram analisados pelo *Software* ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). A análise estatística dos dados foi realizada no Prisma 5.1 (GraphPad San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Padronização do inóculo

O inóculo padrão escolhido foi de 40.000 trofozoítos/tubo para as duas cepas utilizadas, JT e CDC 085. Esse inóculo foi o escolhido, pois, foi o que apresentou após 48 h de incubação em estufa a 37 °C uma fase logarítmica de crescimento. Os inóculos de 60.000/tubo e 80.000/tubo exibiram culturas com características muito semelhantes entre si, apresentando trofozoítos arredondados, em grumos, em processo de degeneração. Dessa forma, os inóculos de 60.000 e 80.000/mL foram considerados inadequados para o uso.

5.2 Potencial de inibição

O MTZ-Cl apresentou potencial de inibição superior ao MTZ tanto para a cepa JT quanto para a cepa CDC 085 (MTZ-resistente). Os trofozoítos de *T. vaginalis* quando em presença dos nitroimidazóis, sofreram alterações morfológicas como vacuolização, perda da capacidade aderente e morte.

5.2.1 Cepa JT

5.2.1.1 Teste com MTZ

Para determinar a CI_{50} do MTZ para a cepa JT de *T. vaginalis*, após um período de exposição de 24 h, o primeiro passo foi identificar o grau de associação entre as variáveis e a tendência de variação que apresentam. Para tanto, construiu-se o gráfico de dispersão ilustrado na Figura 13A.

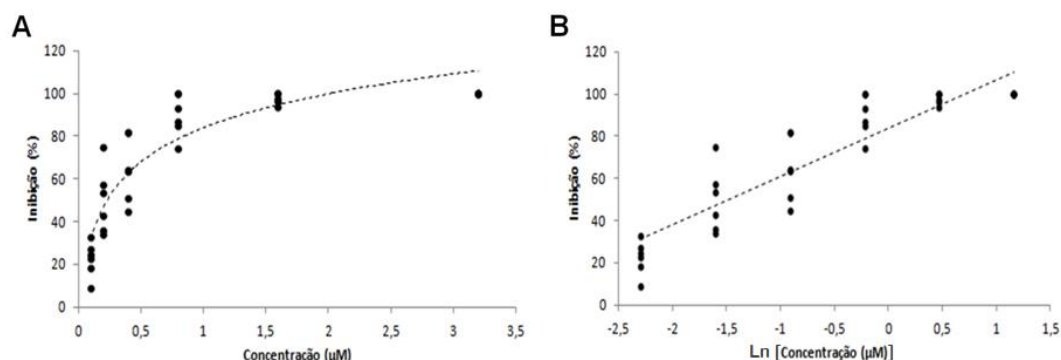


Figura 13- **A)** Gráfico de dispersão MTZ 24h para a cepa JT (Inibição x Concentração). **B)** Gráfico de dispersão MTZ 24h para a cepa JT (Inibição x Ln[Concentração])

Pela análise da Figura 13A observa-se que a relação entre concentração e percentual de inibição não é linear, apresentando uma curvatura próxima da curva exponencial. Desta forma, os resultados inviabilizam a obtenção do modelo de regressão linear para os dados em sua forma natural, tornando necessária a realização de uma transformação das variáveis de forma a tornar a relação linear. Uma forma de tornar a relação observada em linear consiste em determinar o logaritmo natural (Ln) da concentração de MTZ (Figura 13B).

Através do teste de significância do modelo (ANOVA) foi possível identificar se a concentração do MTZ influenciou de forma significativa no percentual de inibição. Foi observado uma probabilidade de significância menor que 0,001, demonstrando que existem evidências de que a concentração do MTZ influenciou de forma significativa na inibição do crescimento do parasito. Os valores do modelo de regressão final obtido são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Modelo de regressão final MTZ 24h (cepa JT)

Variável Resposta	Variável Explicativa	Coefficientes	P-valor (Coefficientes)	R ² Ajustado	P-valor (ANOVA)
Percentual de Inibição	Constante	$\beta_0=83,8$	< 0,001	0,831	0,001
	Ln (Concentração)	$\beta_1=23,0$	< 0,001		

Percentual de Inibição = $\beta_0 + \beta_1 * \text{Ln (Concentração)}$.

A partir da análise da Tabela 2, observa-se que tanto o intercepto (β_0) quanto o coeficiente angular (β_1) ajustados foram significativos, valor de $p < 0,05$, mostrando que o logaritmo da concentração de MTZ é importante para explicar o percentual de inibição do protozoário. O valor positivo do coeficiente angular indica que quanto maior a concentração da substância, maior será o percentual de inibição.

O coeficiente de determinação ajustado (R^2 aj.) obtido para o modelo foi de 0,831, mostrando que 83,1% da variabilidade da resposta é explicada pelo logaritmo da concentração da substância. Os outros 16,9% são explicados por outros fatores não contemplados neste estudo. Esse valor é considerado satisfatório. O desvio padrão do modelo ajustado foi de 12,4%.

Não foram encontrados *outliers* e os resíduos possuem variância aproximadamente constante em torno da média 0, sendo independentes e normalmente distribuídos. Assim, conclui-se que o modelo é adequado.

A etapa final foi determinar o valor da CI_{50} . Para tanto, utilizou-se a técnica de Regressão Inversa, conhecida também como calibração (WERKEMA & AGUIAR, 2006). A equação de regressão obtida é descrita a seguir:

$$Inibição(\%) = 83,8 + 23,0 \cdot \ln(Concentração\ MTZ)$$

$$Concentração(MTZ) = \exp\left(\frac{Inibição - 83,8}{23,0}\right)$$

Substituindo o termo *Inibição* por 50 na equação acima, conclui-se que o valor da CI_{50} estimada para o MTZ é de 0,229 (μM). O erro padrão foi de 1,28 (μM). Para um cálculo mais preciso, torna-se necessário a construção do intervalo de confiança. A Tabela 3 apresenta o valor estimado para a CI_{50} bem como seu intervalo com 90% e 95% de confiança.

Tabela 3- Estimativa Intervalar da CI_{50} de MTZ (24h) para cepa JT.

	CI_{50} (μ M)	Intervalo de Confiança	Inferior	Superior
MTZ	0,229	95%	0,139	0,380
		90%	0,151	0,349

A partir da análise Tabela 3 é possível concluir que a concentração de MTZ necessária para a redução de 50% da população de parasitos da cepa JT de *T. vaginalis* no intervalo de 24 h foi de 0,229 (μ M) variando de 0,139 a 0,380 μ M com 95% de confiança e de 0,151 a 0,349 μ M com 90% de confiança.

Prosseguindo com a determinação da CI_{50} do MTZ para cepa JT agora após período de exposição de 48 h, foi realizada, da mesma forma que a análise anterior, a construção do gráfico de dispersão Inibição x Concentração (Figura 14A).

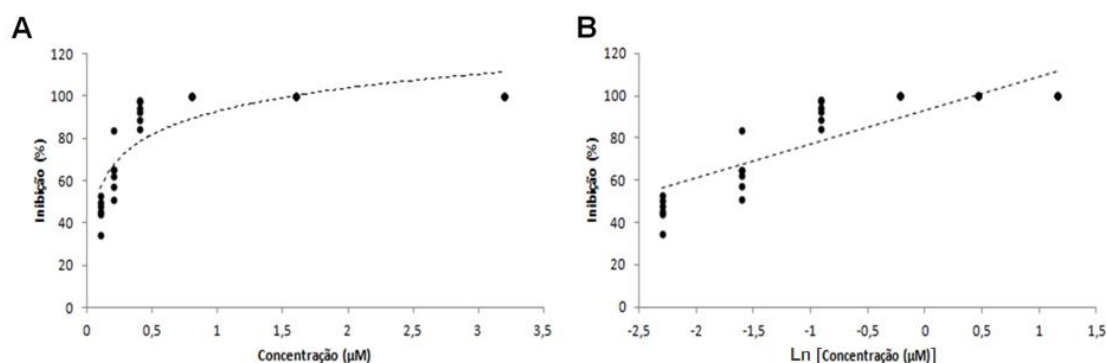


Figura 14- **A)** Gráfico de dispersão MTZ 48h para a cepa JT (Inibição x Concentração). **B)** Gráfico de dispersão MTZ 48h para a cepa JT (Inibição x Ln [Concentração]).

Observou-se que a linha de tendência entre a concentração e o percentual de inibição do crescimento também não apresentou linearidade. Assim, os dados foram tratados para que a relação se tornasse linear através da determinação do Ln da variável concentração de MTZ (Figura 14B).

Através do uso da escala logarítmica foi possível estimar a relação entre a concentração do MTZ e o percentual de inibição após 48 h. De acordo com a análise de variância, observou-se uma probabilidade de significância menor que 0,001, demonstrando que existem evidências

de que a concentração do MTZ impacta de forma significativa na inibição do crescimento do parasito (Tabela 4).

Tabela 4- Modelo de regressão final MTZ 48h (cepa JT).

Variável Resposta	Variável Explicativa	Coefficientes	P-valor (Coefficientes)	R ² Ajustado	P-valor (ANOVA)
Percentual de Inibição	Constante	$\beta_0=92,8$	< 0,001	0,738	0,001
	Ln (Concentração)	$\beta_1=15,9$	< 0,001		

Percentual de Inibição = $\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{Ln (Concentração)}$.

Analizando os dados da Tabela 4, observa-se que tanto o intercepto (β_0) quanto o coeficiente angular (β_1) ajustados foram significativos ($p < 0,05$), mostrando que o uso do logaritmo da concentração do MTZ é importante para se explicar o percentual de inibição.

O coeficiente de determinação ajustado (R^2 aj) foi de 0,738, significando que 73,8% da variabilidade da resposta é explicada pelo logaritmo da concentração da substância. Os outros 26,2% são explicados por outros fatores não contemplados neste estudo, sendo esse valor considerado satisfatório. O desvio padrão do modelo ajustado é de 11,3%.

Não foram encontrados *outliers* e os resíduos possuem variância aproximadamente constante em torno da média 0, sendo independentes e normalmente distribuídos, o que valida o modelo utilizado. A próxima etapa foi estimar o valor da CI_{50} utilizando a técnica de Regressão Inversa. A equação de regressão obtida está descrita a seguir:

$$\text{Inibição}(\%) = 92,8 + 15,9 \cdot \text{Ln}(\text{Concentração MTZ})$$

$$\text{Concentração}(\text{MTZ}) = \exp\left(\frac{\text{Inibição} - 92,8}{15,9}\right)$$

O valor da CI_{50} estimada para o MTZ é de 0,068 (μM). O erro padrão estimado foi de 1,46 (μM). A Tabela 5 apresenta o valor estimado para a CI_{50} bem como seu intervalo com 90% e 95% de confiança.

Tabela 5- Estimativa Intervalar da CI_{50} de MTZ (48h) para cepa JT.

Substância	CI_{50} (μ M)	Intervalo de Confiança	Inferior	Superior
MTZ	0,068	95%	0,032	0,147
		90%	0,036	0,129

A partir dos resultados encontrados na Tabela 5, concluiu-se que a CI_{50} do MTZ para a cepa JT de *T. vaginalis* após 48 h de exposição é de 0,068 μ M, variando de 0,032 a 0,147 μ M com confiança de 95% e de 0,036 a 0,129 μ M considerando confiança de 90%.

5.2.1.2 Teste com MTZ-Cl

Para identificação da CI_{50} de 24 h para o MTZ-Cl em relação à cepa JT foi construído, como nos testes anteriores, o gráfico de dispersão Inibição x Concentração para a identificação da relação existente entre a concentração da substância e o percentual de inibição (Figura 15A). Como a relação estabelecida não foi linear, os dados foram tratados através da determinação do Ln da variável concentração do MTZ-Cl para que a relação se tornasse linear (Figura 15 B).

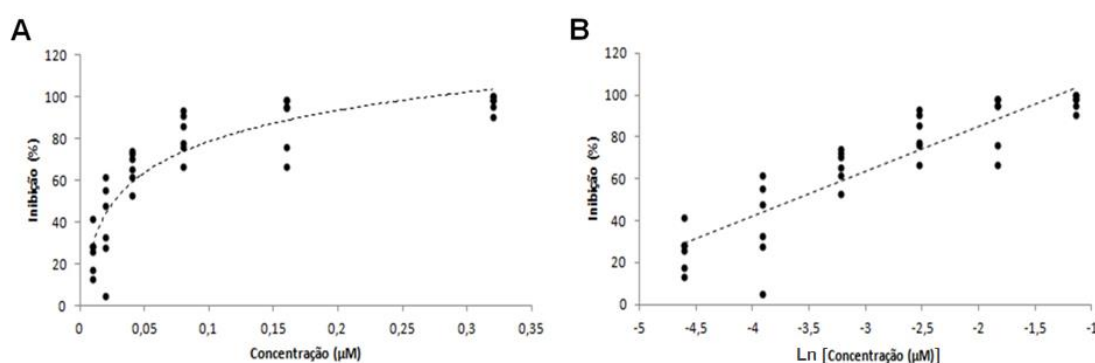


Figura 15- **A)** Gráfico de dispersão MTZ-Cl 24h para a cepa JT (Inibição x Concentração). **B)** Gráfico de dispersão MTZ-Cl 24h para a cepa JT (Inibição x Ln[Concentração]).

Através do teste ANOVA, verificou que a concentração do MTZ-Cl influenciou de forma significativa no percentual de inibição com uma probabilidade de significância menor que 0,001. O modelo obtido é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Modelo de regressão final MTZ-Cl 24h (cepa JT).

Variável Resposta	Variável Explicativa	Coefficientes	P-valor (Coefficientes)	R ² Ajustado	P-valor (ANOVA)
Percentual de Inibição	Constante	$\beta_0=127,9$	$< 0,001$	0,798	0,001
	Ln (Concentração)	$\beta_1=21,5$	$< 0,001$		

Percentual de Inibição = $\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{Ln (Concentração)}$.

A partir da análise da Tabela 6, observa-se que tanto o intercepto (β_0) quanto o coeficiente angular (β_1) ajustados foram significativos ($p < 0,05$), mostrando que o logaritmo da concentração de MTZ-Cl é importante para explicar o percentual de inibição do protozoário em 24h.

O coeficiente de determinação ajustado (R^2 aj.) obtido para o modelo foi de 0,798, significando que 79,8% da variabilidade da resposta do percentual de inibição em 24h é explicada pelo logaritmo da concentração da substância.. Esse valor é considerado satisfatório. O desvio padrão do modelo ajustado foi de 12,9%.

Não foram encontrados *outliers* e os resíduos possuem variância aproximadamente constante em torno da média 0, são independentes e normalmente distribuídos. Assim, conclui-se que o modelo é adequado.

Foi estimado o valor da CI_{50} com o uso da técnica de Regressão Inversa. A equação de regressão é descrita a seguir.

$$\text{Inibição}(\%) = 127,9 + 21,5 \cdot \text{Ln}(\text{Concentração MTZ} - \text{Cl})$$

$$\text{Concentração}(\text{MTZ} - \text{Cl}) = \exp\left(\frac{\text{Inibição} - 127,9}{21,5}\right)$$

O valor da CI_{50} estimada para o MTZ-Cl é de 0,027 (μM). O erro padrão para o CI_{50} foi 1,31 (μM). A Tabela 7 apresenta o valor estimado para a CI_{50} bem como seu intervalo com 90% e 95% de confiança.

Tabela 7- Estimativa Intervalar da CI_{50} de MTZ-Cl (24h) para cepa JT.

Substância	CI_{50} (μ M)	Intervalo de Confiança	Inferior	Superior
MTZ-Cl	0,027	95%	0,015	0,046
		90%	0,017	0,042

A partir dos dados da Tabela 7, concluiu-se que a CI_{50} do MTZ-Cl para cepa JT de *T. vaginalis*, após 24 h de exposição, foi de 0,027 (μ M) variando de 0,015 a 0,046 μ M, com confiança de 95% e de 0,017 a 0,042 μ M considerando confiança de 90%.

Para determinar a CI_{50} MTZ-Cl também após o período de exposição de 48 h, foi construído o gráfico de dispersão Inibição x Concentração (Figura 15 A).

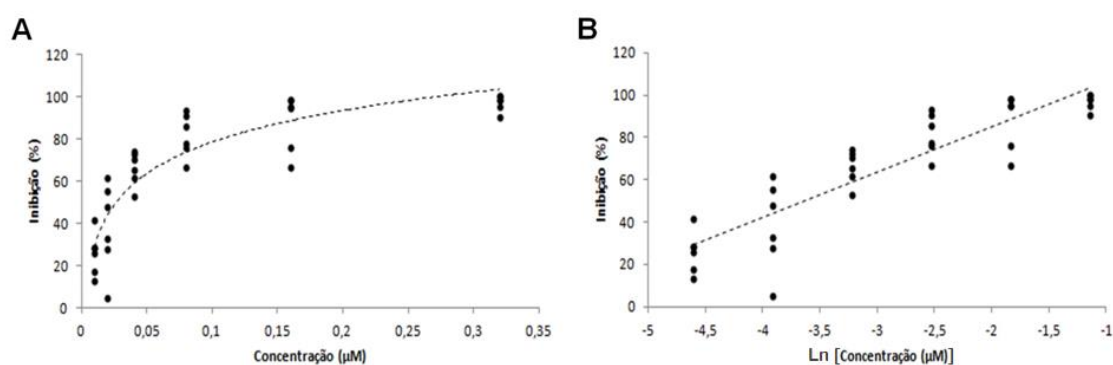


Figura 16- **A)** Gráfico de dispersão MTZ-Cl 48h para cepa JT (Inibição x Concentração). **B)** Gráfico de dispersão MTZ-Cl 48h para cepa JT (Inibição x Ln[Concentração])

A relação existente entre concentração de MTZ-Cl e o percentual de inibição não é linear, apresentando uma curvatura próxima da curva exponencial. Assim os dados foram tratados como anteriormente, tornando a relação linear através da determinação Ln da variável concentração do MTZ-Cl (Figura 16B).

Através do uso de ANOVA, verificou-se que a concentração do MTZ-Cl influenciou de forma significativa no percentual de inibição do parasito, com uma probabilidade de significância menor que 0,001. Os resultados do modelo obtido é apresentado na Tabela 8.

Tabela 8- Modelo de regressão final MTZ-Cl 48h (cepa JT).

Variável Resposta	Variável Explicativa	Coefficientes	P-valor (Coefficientes)	R ² Ajustado	P-valor (ANOVA)
Percentual de Inibição	Constante	$\beta_0=124,6$	$< 0,001$	0,686	0,001
	Ln (Concentração)	$\beta_1=14,7$	$< 0,001$		

Percentual de Inibição = $\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{Ln (Concentração)}$.

A partir da análise da Tabela 8, observa-se que tanto o intercepto (β_0) quanto o coeficiente angular (β_1) ajustados foram significativos ($p < 0,05$), mostrando que o logaritmo da concentração de MTZ-Cl é importante para explicar o percentual de inibição do protozoário em 48hs.

O coeficiente de determinação ajustado (R^2 aj.) obtido para o modelo foi de 0,686, o que significa que 68,6% da variabilidade da resposta é explicada pelo logaritmo da concentração do fármaco. Esse valor é considerado satisfatório. O desvio padrão do modelo ajustado é de 11,9%.

Do modelo final obtido não foram encontrados *outliers*. Assim, passou-se para validação do modelo obtido. A análise dos resíduos mostra que estes possuem variância aproximadamente constante em torno da média 0, são independentes e normalmente distribuídos, $p > 0,05$. Assim, conclui-se que o modelo é adequado.

Foi estimado o valor da CI_{50} utilizando a técnica de Regressão Inversa, como feito nos testes anteriores. A equação de regressão obtida é descrita a seguir:

$$\text{Inibição}(\%) = 124,6 + 14,7 \cdot \text{Ln}(\text{Concentração})$$

$$\text{Concentração}(\text{MTZ} - \text{Cl}) = \exp\left(\frac{\text{Inibição} - 124,6}{14,7}\right)$$

O valor da CI_{50} estimada para o MTZ-Cl para o intervalo de 48 h é de 0,006 (μM). O erro padrão para a CI_{50} foi 1,54 (μM). A Tabela 9 apresenta o valor estimado para a CI_{50} bem como seu intervalo com 90% e 95% de confiança.

Tabela 9- Estimativa Intervalar da CI_{50} MTZ-Cl (48h) para cepa JT.

Substância	CI_{50} (μM)	Intervalo de Confiança	Inferior	Superior
MTZ-Cl	0,006	95%	0,003	0,015
		90%	0,003	0,013

A partir da análise da Tabela 9 é possível concluir que a CI_{50} do MTZ-Cl para cepa JT de *T. vaginalis* após 48h de exposição foi de 0,006 (μM) variando de 0,003 a 0,015 com confiança de 95% e de 0,003 a 0,013, considerando confiança de 90%.

5.2.2 Cepa CDC 085

5.2.2.1 Teste com MTZ

Para determinar a CI_{50} do MTZ frente a cepa CDC 085 de *T. vaginalis* após período de exposição de 24 h foi construído o gráfico de dispersão Inibição x Concentração, para a identificação do grau de associação entre as variáveis e a tendência de variação que apresentam (Figura 17A).

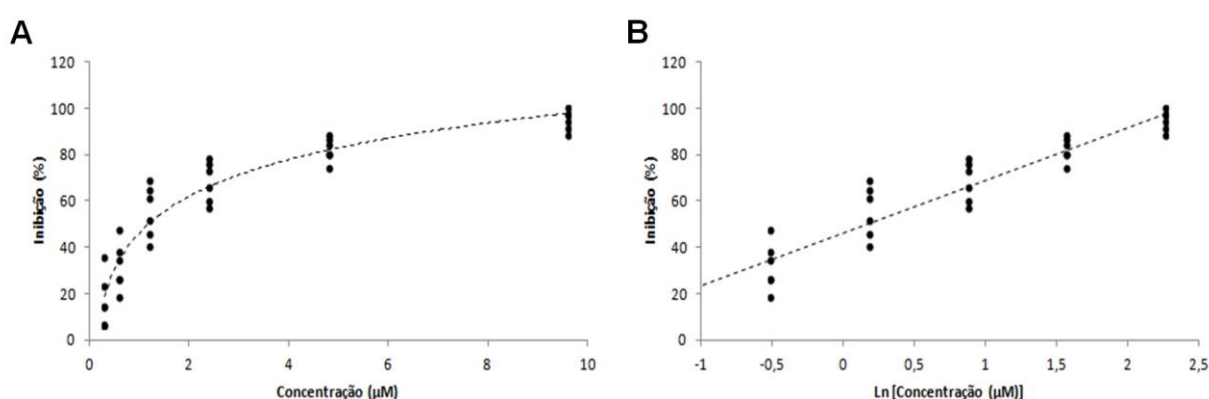


Figura 17- A) Gráfico de dispersão MTZ 24h para a cepa CDC 085 (Inibição x Concentração). B) Gráfico de dispersão MTZ 24h para a cepa CDC 085 (Inibição x $\text{Ln}[\text{Concentração}]$)

Como observado nos testes descritos anteriormente, a relação existente entre concentração de MTZ e o percentual de inibição não é linear. Assim os dados foram tratados como anteriormente, tornando a relação linear através da determinação do Ln da variável concentração do MTZ (Figura 17B).

Utilizando ANOVA foi possível identificar se a concentração do MTZ influenciou de forma significativa no percentual de inibição. De acordo com a análise de variância, foi observado uma probabilidade de significância menor que 0,001, demonstrando que existem evidências de que a concentração do MTZ influenciou de forma significativa na inibição do crescimento do parasito. O modelo obtido é apresentado na Tabela 10.

Tabela 10- Modelo de regressão final MTZ 24h (cepa CDC 085).

Variável Resposta	Variável Explicativa	Coefficientes	P-valor (Coefficientes)	R ² Ajustado	P-valor (ANOVA)
Percentual de Inibição	Constante	$\beta_0=46,2$	< 0,001	0,903	< 0,001
	Ln (Conc.)	$\beta_1=22,8$	< 0,001		

Percentual de Inibição = $\beta_0 + \beta_1 * \text{Ln (Concentração)}$.

A partir da análise da Tabela 10, observa-se que tanto o intercepto (β_0) quanto o coeficiente angular (β_1) ajustados foram significativos ($p < 0,05$), mostrando que o logaritmo da concentração de MTZ é importante para explicar o percentual de inibição do parasito.

O coeficiente de determinação ajustado (R^2 aj.) obtido para o modelo foi de 0,903, mostrando que 90,3% da variabilidade da resposta do percentual de inibição em 24h é explicada pelo logaritmo da concentração da substância. Esse valor foi considerado satisfatório. O desvio padrão do modelo ajustado foi de 8,9%.

Não foram encontrados *outliers* e os resíduos possuem variância aproximadamente constante em torno da média 0, sendo independentes e normalmente distribuídos. Assim, conclui-se que o modelo é adequado.

Utilizando a técnica de Regressão Inversa, foi estimado o valor da CI_{50} . A equação de regressão obtida é descrita a seguir.

$$Inibição(\%) = 46,2 + 22,8 \cdot \ln(Concentração\ MTZ)$$

$$Concentração(MTZ) = \exp\left(\frac{Inibição - 46,2}{22,8}\right)$$

O valor de CI_{50} estimado para o MTZ é de 1,18 (μM). O erro padrão para a CI_{50} foi 1,19 (μM). A Tabela 11 apresenta o valor estimado para a CI_{50} bem como seu intervalo com 90% e 95% de confiança.

Tabela 11- Estimativa Intervalar da CI_{50} de MTZ (24h) para cepa CDC 085.

Substância	CI_{50} (μM)	Erro Padrão	Intervalo de Confiança	Inferior	Superior
MTZ	1,18	1,19	95%	0,83	1,68
			90%	0,88	1,59

A partir da análise Tabela 11 foi possível concluir que a concentração de MTZ necessária para redução de 50% da população do protozoário é de 1,18 (μM) variando de 0,83 a 1,68 com 95% de confiança e 0,88 a 1,59 considerando uma confiança de 90%.

Para a determinação da CI_{50} do MTZ sobre a cepa CDC 085 também após um período de exposição de 48 h, foi identificado o grau de associação entre as variáveis e a tendência de variação que apresentam. Para tanto, construiu-se o gráfico de dispersão (Figura 18A).

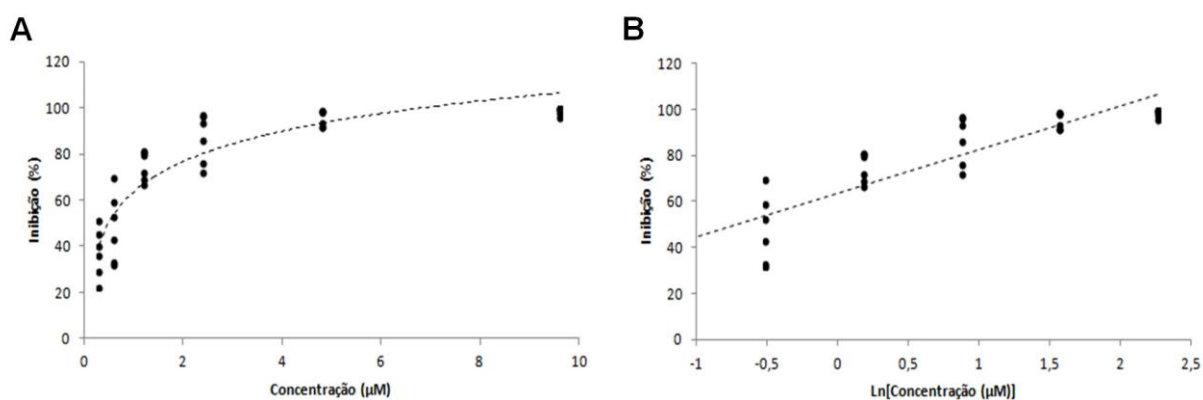


Figura 18- A) Gráfico de dispersão MTZ 48h para a cepa CDC 085 (Inibição x Concentração). B) Gráfico de dispersão MTZ 48h para a cepa CDC 085 (Inibição x Ln[Concentração])

Observa-se que a relação existente entre concentração de MTZ e o percentual de inibição em 48 h também não é linear. Para tanto, foi determinado o Ln dos dados tornando, dessa forma, a relação concentração do MTZ x Inibição, linear (Figura 18B).

Através do teste ANOVA, verificou-se que a concentração do MTZ influenciou de forma significativa no percentual de inibição do parasito, com uma probabilidade de significância menor que 0,001. O modelo obtido é apresentado na Tabela 12.

Tabela 12- Modelo de regressão final MTZ 48h (cepa CDC 085).

Variável Resposta	Variável Explicativa	Coefficientes	P-valor (Coefficientes)	R ² Ajustado	P-valor (ANOVA)
Percentual de Inibição	Constante	$\beta_0=63,6$	< 0,001	0,819	< 0,001
	Ln (Concentração)	$\beta_1=18,9$	< 0,001		

Percentual de Inibição = $\beta_0 + \beta_1 * \text{Ln (Concentração)}$.

A partir da análise da Tabela 12, observa-se que tanto o intercepto (β_0) quanto o coeficiente angular (β_1) ajustados foram significativos ($p < 0,05$) mostrando que o logaritmo da concentração de MTZ é importante para explicar o percentual de inibição do protozoário em 48h.

O coeficiente de determinação ajustado (R^2 aj.) obtido para o modelo foi de 0,819, mostrando que 81,9% da variabilidade da resposta do percentual de inibição em 48h é explicada pelo logaritmo da concentração da substância. Esse valor é considerado satisfatório. O desvio padrão do modelo ajustado é de 10,6%.

Não foram encontrados *outliers* e os resíduos possuem variância aproximadamente constante em torno da média 0, sendo independentes e normalmente distribuídos. Assim, conclui-se que o modelo é adequado.

Determinou-se o valor da CI_{50} utilizando a técnica de Regressão Inversa. A equação de regressão obtida é descrita a seguir:

$$Inibição(\%) = 63,6 + 18,9 \cdot \ln(Concentração\ MTZ)$$

$$Concentração(MTZ) = \exp\left(\frac{Inibição - 63,6}{18,9}\right)$$

O valor da CI_{50} estimada para o MTZ é de 0,49 (μM). O erro padrão para a CI_{50} estimada foi 1,31 (μM). A Tabela 13 apresenta o valor estimado para a CI_{50} bem como seu intervalo com 90% e 95% de confiança.

Tabela 13- Estimativa Intervalar da CI_{50} de MTZ (48h) para cepa CDC 085.

Substância	CI_{50} (μM)	Erro Padrão	Intervalo de Confiança	Inferior	Superior
MTZ	0,49	1,31	95%	0,28	0,84
			90%	0,31	0,76

A partir da análise da Tabela 13 foi possível concluir que a concentração de MTZ necessária para redução de 50% da população da cepa CDC 085 de *T. vaginalis*, após 48h de exposição, foi de 0,49 (μM), variando de 0,28 a 0,84 com confiança de 95% e de 0,31 a 0,76 se a confiança considerada for de 90%.

5.2.2.2 Teste com MTZ-Cl

Para identificação da CI_{50} do MTZ-Cl para a cepa CDC 085 de *T. vaginalis*, foi construído o gráfico de dispersão Inibição x Concentração, para a identificação da relação existente entre a concentração da substância e o percentual de inibição (Figura 19A).

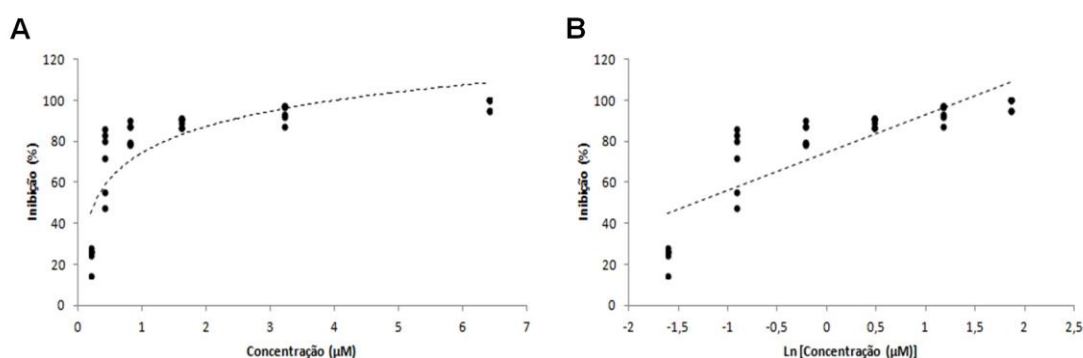


Figura 19- A) Gráfico de dispersão MTZ-Cl 24h para a cepa CDC 085 (Inibição x Concentração). B) Gráfico de dispersão MTZ-Cl 24h para a cepa CDC 085 (Inibição x Ln[Concentração])

Observa-se que a relação existente entre concentração de MTZ-Cl e o percentual de inibição em 24 h não apresenta distribuição linear. Dessa forma, os dados foram tratados através da determinação do Ln para que a relação se tornasse relação linear (Figura 19B).

Através do teste ANOVA, verificou-se que a concentração do MTZ-Cl influenciou de forma significativa no percentual de inibição do parasito, com uma probabilidade de significância menor que 0,001. O modelo obtido é apresentado na Tabela 14.

Tabela 14- Modelo de regressão final MTZ-Cl 24h (cepa CDC 085).

Variável Resposta	Variável Explicativa	Coefficientes	P-valor (Coefficientes)	R ² Ajustado	P-valor (ANOVA)
Percentual de Inibição	Constante	$\beta_0=74,4$	< 0,001	0,696	< 0,001
	Ln (Concentração)	$\beta_1=18,4$	< 0,001		

Percentual de Inibição = $\beta_0 + \beta_1 * \text{Ln (Concentração)}$.

A partir da análise da Tabela 14, observa-se que tanto o intercepto (β_0) quanto o coeficiente angular (β_1) ajustados foram significativos ($p<0,05$), mostrando que o logaritmo da concentração de MTZ-Cl é importante para explicar o percentual de inibição do parasito em 24h.

O coeficiente de determinação ajustado (R^2 aj.) obtido para o modelo foi de 0,696, mostrando que 69,6% da variabilidade da resposta, o percentual de inibição em 24h é explicada pelo logaritmo da concentração da substância. Esse valor é considerado satisfatório. O desvio padrão do modelo ajustado é de 14,5%.

Não foram encontrados *outliers* e os resíduos possuem variância aproximadamente constante em torno da média 0, são independentes e normalmente distribuídos, $p<0,05$. Assim, conclui-se que o modelo é adequado.

Para a estimativa do valor da CI_{50} foi utilizada a técnica de Regressão Inversa. A equação de regressão é descrita a seguir.

$$Inibição(\%) = 74,4 + 18,4 \cdot \ln(Concentração\ MTZ - Cl)$$

$$Concentração(MTZ - Cl) = \exp\left(\frac{Inibição - 74,4}{18,4}\right)$$

Conclui-se que o valor da CI_{50} estimada para o parasito é de 0,27 (μM). O erro padrão para a CI_{50} foi 1,47 (μM). A Tabela 15 apresenta o valor estimado para a CI_{50} bem como seu intervalo com 90% e 95% de confiança.

Tabela 15- Estimativa Intervalar da CI_{50} MTZ-Cl (24h) para cepa CDC 085.

Substância	CI_{50} (μM)	Erro Padrão	Intervalo de Confiança	Inferior	Superior
MTZ-Cl	0,27	1,47	95%	0,12	0,58
			90%	0,14	0,51

A partir da análise Tabela 15 foi possível concluir que a concentração de MTZ-Cl necessária para redução de 50% da população da cepa CDC 085 de *T. vaginalis* em 24h foi de 0,27 (μM), variando de 0,12 a 0,58 com 95% de confiança e 0,14 a 0,51 se considerado uma confiança de 90%.

Para identificação da CI_{50} do MTZ-Cl para a cepa CDC 085 de *T. vaginalis* também após exposição de 48h, foi identificada a relação existente entre a concentração da substância e o percentual de inibição causada pela mesma. Para isso, foi construído o gráfico de dispersão a seguir (Figura 20A).

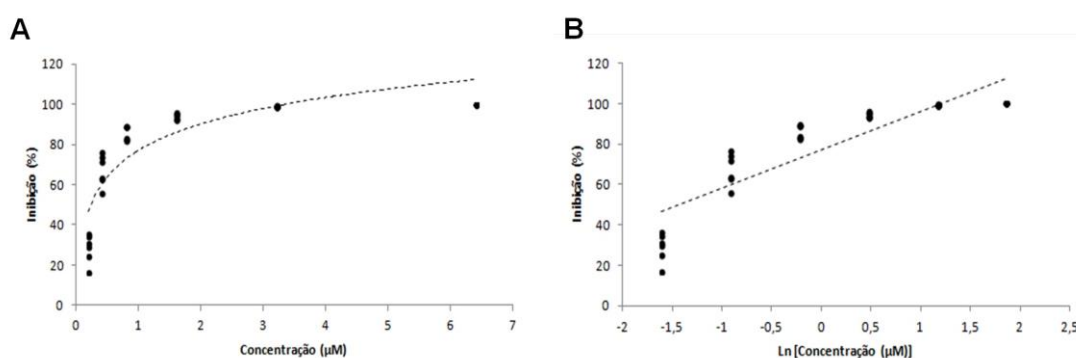


Figura 20- A) Gráfico de dispersão MTZ-Cl 48h para a cepa CDC 085 (Inibição x Concentração). B) Gráfico de dispersão MTZ-Cl 48h para a cepa CDC 085 (Inibição x Ln [Concentração])

A relação existente entre concentração de MTZ-Cl e o percentual de inibição em 48 h não é linear, o que inviabiliza a obtenção do modelo de regressão linear. Por isso, os dados foram tratados através da determinação do Ln para que a relação se tornasse linear (Figura 20B)

Através do teste ANOVA, verificou-se que a concentração do MTZ-Cl influenciou de forma significativa no percentual de inibição do parasito com uma probabilidade de significância menor que 0,001. O modelo obtido é apresentado na Tabela 16.

Tabela 16- Modelo de regressão final de MTZ-Cl 48h (cepa CDC 085).

Variável Resposta	Variável Explicativa	Coefficientes	P-valor (Coefficientes)	R ² Ajustado	P-valor (ANOVA)
Percentual de Inibição	Constante	$\beta_0=77,0$	< 0,001	0,768	< 0,001
	Ln (Concentração)	$\beta_1=19,0$	< 0,001		

Percentual de Inibição = $\beta_0 + \beta_1 * \text{Ln (Concentração)}$.

A partir da análise da Tabela 16, observa-se que tanto o intercepto (β_0) quanto o coeficiente angular (β_1) ajustados foram significativos, p-valor menor que 0,05, mostrando que o logaritmo da concentração de MTZ-Cl é importante para explicar o percentual de inibição do parasito em 48h.

O coeficiente de determinação ajustado (R^2 aj.) obtido para o modelo foi de 0,768, mostrando que 76,8% da variabilidade da resposta, o percentual de inibição em 48h é explicada pelo logaritmo da concentração da substância. Os outros 24,2% são explicados por outros fatores não contemplados neste estudo. Esse valor é considerado satisfatório. O desvio padrão do modelo ajustado é de 12,4%.

Não foram encontrados *outliers*. A análise dos resíduos mostra que estes possuem variância aproximadamente constante em torno da média 0, são independentes e normalmente distribuídos, $p>0,05$. Assim, conclui-se que o modelo é adequado.

Para a estimativa do valor da CI_{50} , utilizou-se a técnica de Regressão Inversa. A equação de regressão obtida é descrita a seguir:

$$Inibição(\%) = 77,0 + 19,0 \cdot \ln(Concentração\ MTZ - CI)$$

$$Concentração(MTZ - CI) = \exp\left(\frac{Inibição - 77,0}{19,0}\right)$$

Conclui-se que o valor da CI_{50} estimada para MTZ-Cl é de 0,24 (μM). O erro padrão para a CI_{50} estimada foi 1,38 (μM), de acordo com o modelo encontrado. A Tabela 17 apresenta o valor estimado para a CI_{50} bem como seu intervalo com 90% e 95% de confiança.

Tabela 17- Estimativa Intervalar da CI_{50} MTZ-Cl (48h) para cepa CDC 085.

Substância	CI_{50} (μM)	Intervalo de Confiança	Intervalo de Confiança	Inferior	Superior
MTZ-Cl	0,24	1,38	95%	0,12	0,46
			90%	0,14	0,42

A partir da análise Tabela 17 é possível concluir que a concentração de MTZ-Cl necessária para redução de 50% da população da cepa CDC 085 de *T. vaginalis* em 48h é de 0,24 (μM), variando de 0,12 a 0,46 com 95% de confiança e 0,14 a 0,42 se a confiança considerada for de 90%. A Tabela 18 resume os resultados de CI_{50} obtidos de MTZ e MTZ-Cl para ambas as cepas:

Tabela 18- Valor de CI_{50} (μM) de MTZ e MTZ-Cl para as cepas JT e CDC 085 de *T. vaginalis* em intervalo de 24 e 48 h

JT		CDC 085	
	24 h	48 h	
MTZ	0,229	0,068	1,18
(μM)	(0,139 – 0,380)*	(0,032 – 0,147)*	(0,83 – 1,68)*
			0,49
			(0,28 – 0,84)*
MTZ-Cl	0,027	0,006	0,27
(μM)	(0,015 – 0,046)*	(0,003 – 0,015)*	(0,12 – 0,58)*
			0,24
			(0,12 – 0,46)*

*Intervalo de confiança 95%

5.3 Citotoxicidade

Após a definição da CI_{50} do MTZ-Cl, testes complementares foram realizados para avaliar a sua citotoxicidade através do ensaio de MTT. A média das absorbâncias (570 nm) de cada concentração testada foi comparada com a média do controle negativo (células associadas apenas com meio de cultura). Para este controle, considerou-se 100% de viabilidade.

Após a realização do teste de citotoxicidade, verificou-se que a amostra de MTZ-Cl nas oito concentrações avaliadas, 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 e 25,6 (μM); foi classificada como não citotóxica, apresentando viabilidade celular que variou entre 86 e 100% (Figura 21 e 22).

MTZ-Cl									
Experimentos	Controle	0,2 μM	0,4 μM	0,8 μM	1,6 μM	3,2 μM	6,4 μM	12,8 μM	25,6 μM
Médias	1,627 $\pm$ 0,091	1,431 $\pm$ 0,173	1,471 $\pm$ 0,138	1,470 $\pm$ 0,153	1,406 $\pm$ 0,265	1,538 $\pm$ 0,203	1,549 $\pm$ 0,189	1,458 $\pm$ 0,114	1,607 $\pm$ 0,064
% Viabilidade	100	88	90	90	86	94	95	89	98

Os resultados indicam média $\pm$ desvio padrão.

Figura 21- Média de absorbância e porcentagem de viabilidade do composto MTZ-Cl, em concentrações entre 0,2-25,6 μM , em teste MTT.

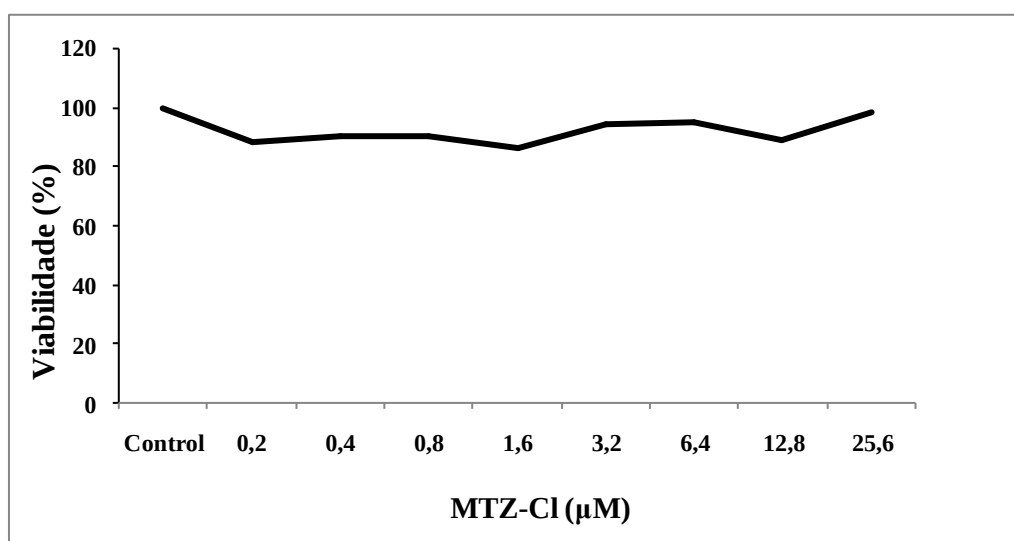


Figura 22- Porcentagem de viabilidade celular em teste (MTT) do MTZ-Cl em célula hepática humana (SK-Hep).

5.4 Toxicidade aguda

A partir do experimento de toxicidade aguda foi possível observar pequenas alterações comportamentais e fisiológicas apresentadas pelos animais sobre a ação do MTZ-Cl em comparação ao MTZ, ao grupo controle e ao grupo controle-solvente. Durante o experimento com dose de MTZ e MTZ-Cl na concentração de 300 mg/Kg, não foi observada qualquer alteração no grupo controle e no grupo controle-solvente. Os animais dos grupos que receberam MTZ e MTZ-Cl apresentaram comportamento mais lento, com pouca locomoção e sonolência até 1 hora após a administração. Não ocorreram mortes durante os 15 dias de ensaio. Devido à ausência de mortes entre os animais, prosseguiu-se com a realização de um novo teste, de acordo com o protocolo OECD 203, semelhante ao anterior, no entanto com a administração de uma concentração muito maior das substâncias, 2000 mg/Kg.

Durante este ensaio, não foram observadas alterações nos animais dos grupos controle e controle-solvente. Os animais que receberam MTZ mostraram comportamento mais lento, com pouca locomoção e sonolência até 1,5 hora após a administração. Já o grupo que recebeu MTZ-Cl, a sonolência permaneceu até 7 horas após a administração. Não foram observadas mudanças significativas no peso corporal e mortes entre os animais testados. Não foi possível a determinação da DL₅₀ (dose letal para 50% da população), pois o método utilizado só permitiria essa determinação se ocorresse mortalidade superior a 0% e inferior a 100% e, durante nossos testes, não foi observado morte de nenhum indivíduo nos grupos avaliados.

A análise macroscópica dos órgãos dos animais dos grupos controle, controle-solvente, MTZ e MTZ-Cl, após administração das substâncias na concentração de 2000 mg/Kg, não apresentou nenhuma alteração. Durante a análise histopatológica (microscópica) não foi observada alterações no coração (Figura 23), pulmão (Figura 24), SNC (Figura 25) e rim (Figura 26) dos animais. No entanto, no fígado foram observadas pequenas alterações nos animais dos grupos que receberam MTZ e MTZ-Cl (Figura 27). No grupo MTZ foi observado hepatócitos apresentando núcleo central, basofílico, por vezes com citoplasma turvo sem formação vesicular intracitoplasmática nítida de localização centro-lobular, enquanto que no fígado dos animais que receberam MTZ-Cl, as alterações observadas foram: hepatócitos com vacúolos intracitoplasmáticos perinucleares (03 amostras) por vezes coalescentes e rechaçando os núcleos para a periferia (01 amostra) de localização centro-lobular. O diagnóstico para o grupo MTZ e MTZ-Cl foram compatíveis com degeneração hepática, com

achados sugestivos de degeneração hidrópica, enquanto que para 1 animal do grupo MTZ-Cl encontrou-se achados sugestivos de degeneração hidrópica associados à esteatose.

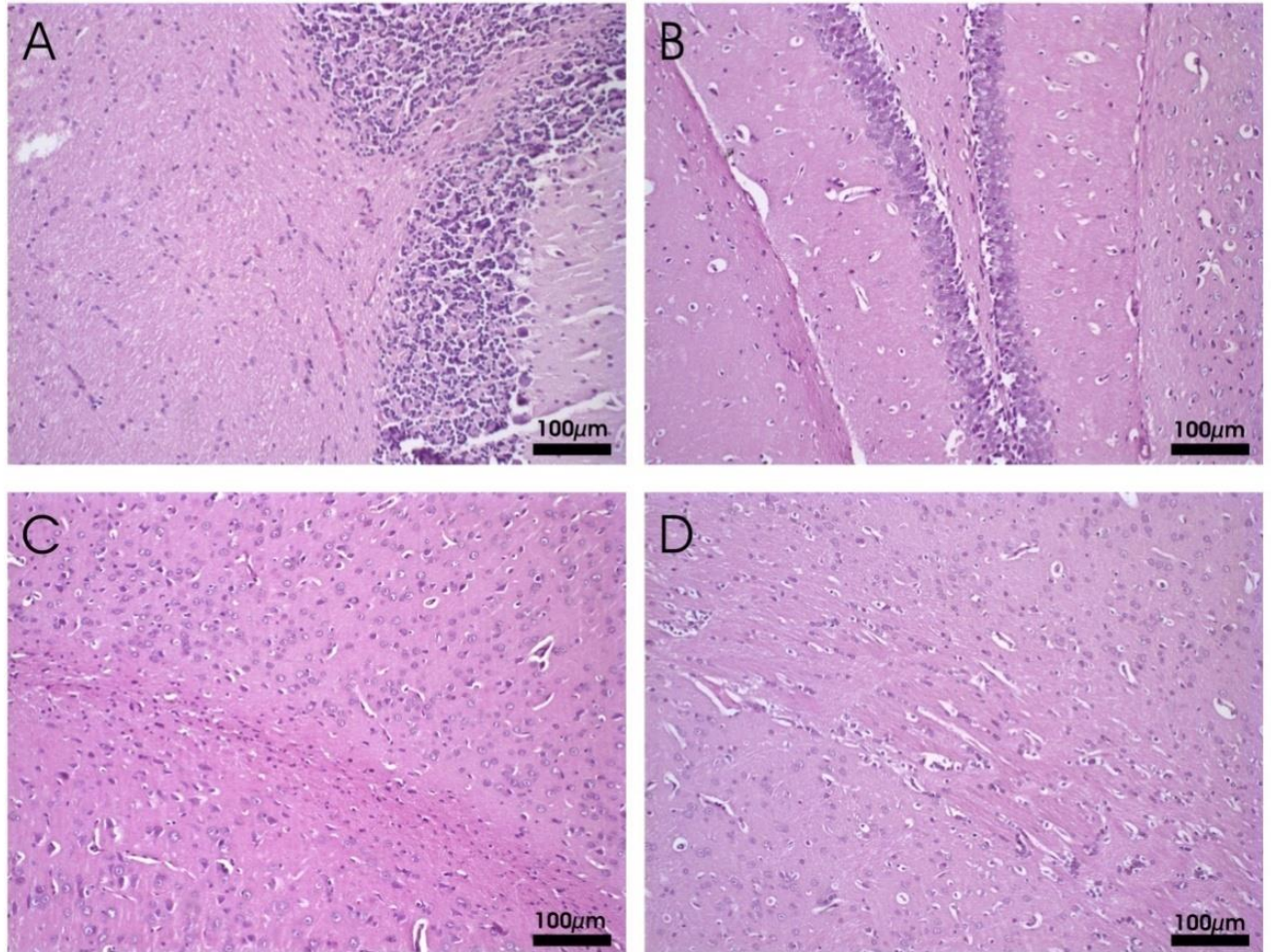


Figura 23- Análise Histopatológica do coração. **A)** Controle, **B)** Controle-Solvente, **C)** MTZ, **D)** MTZ-Cl. HE, 20x- Sem alterações aparentes.

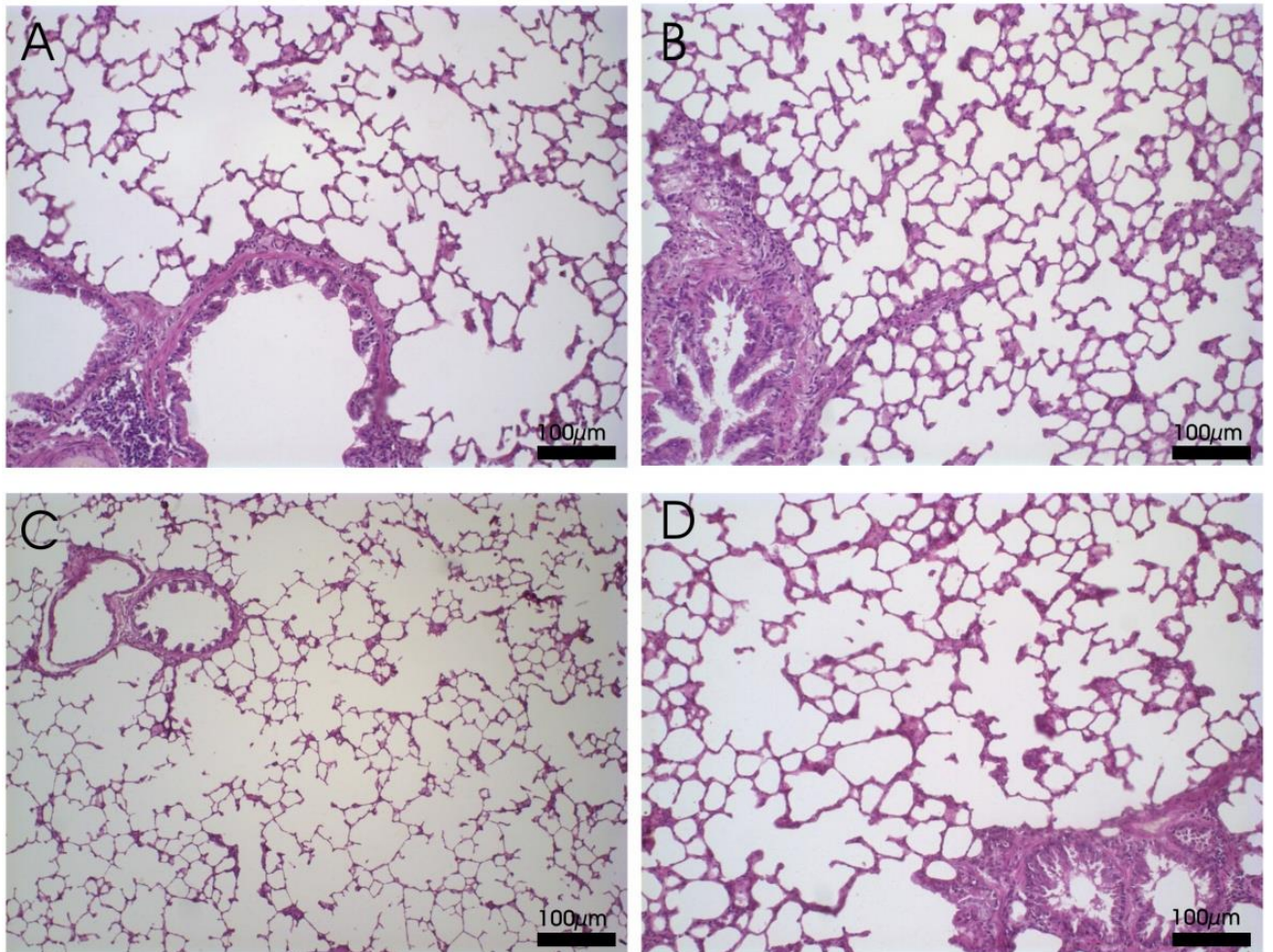


Figura 24 - Análise Histopatológica do pulmão. **A)** Controle, **B)** Controle-Solvente, **C)** MTZ, **D)** MTZ-Cl. HE, 20x- Sem alterações aparentes

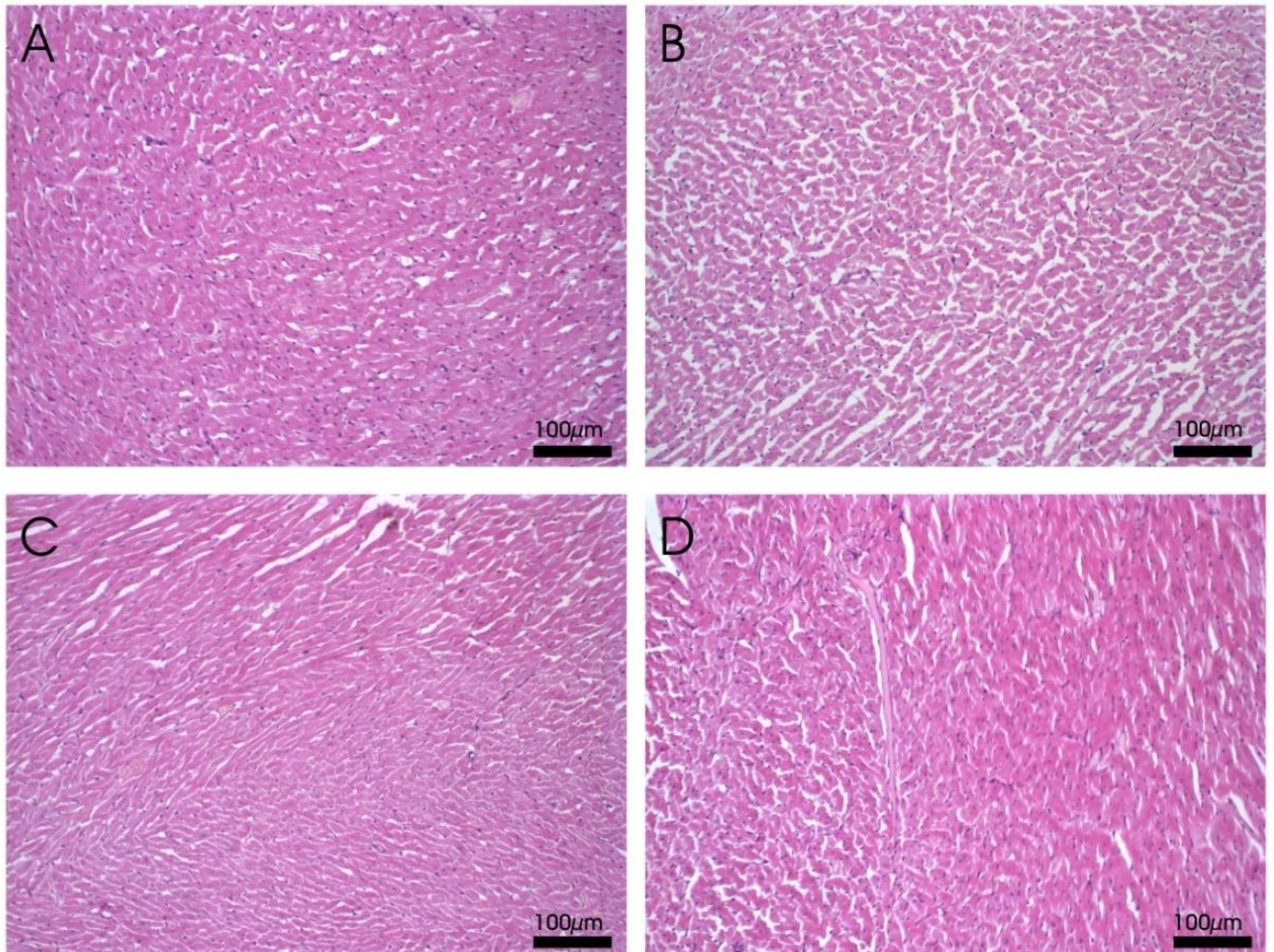


Figura 25 - Análise Histopatológica do SNC. **A)** Controle, **B)** Controle-Solvente, **C)** MTZ, **D)** MTZ-Cl. HE, 20x- Sem alterações aparentes.

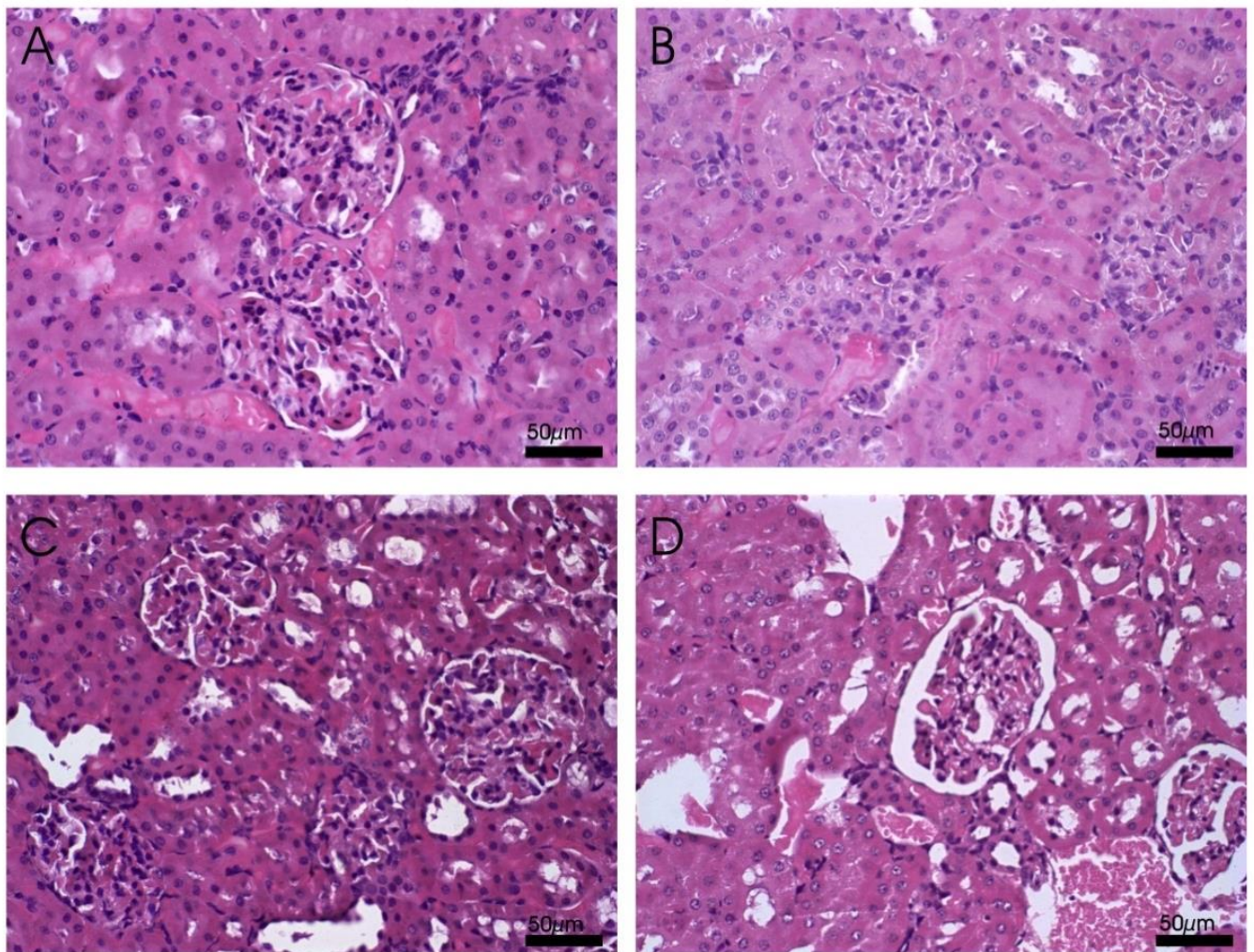


Figura 26 - Análise Histopatológica do rim. **A)** Controle, **B)** Controle-Solvente, **C)** MTZ, **D)** MTZ-Cl. HE, 40x- Sem alterações aparentes

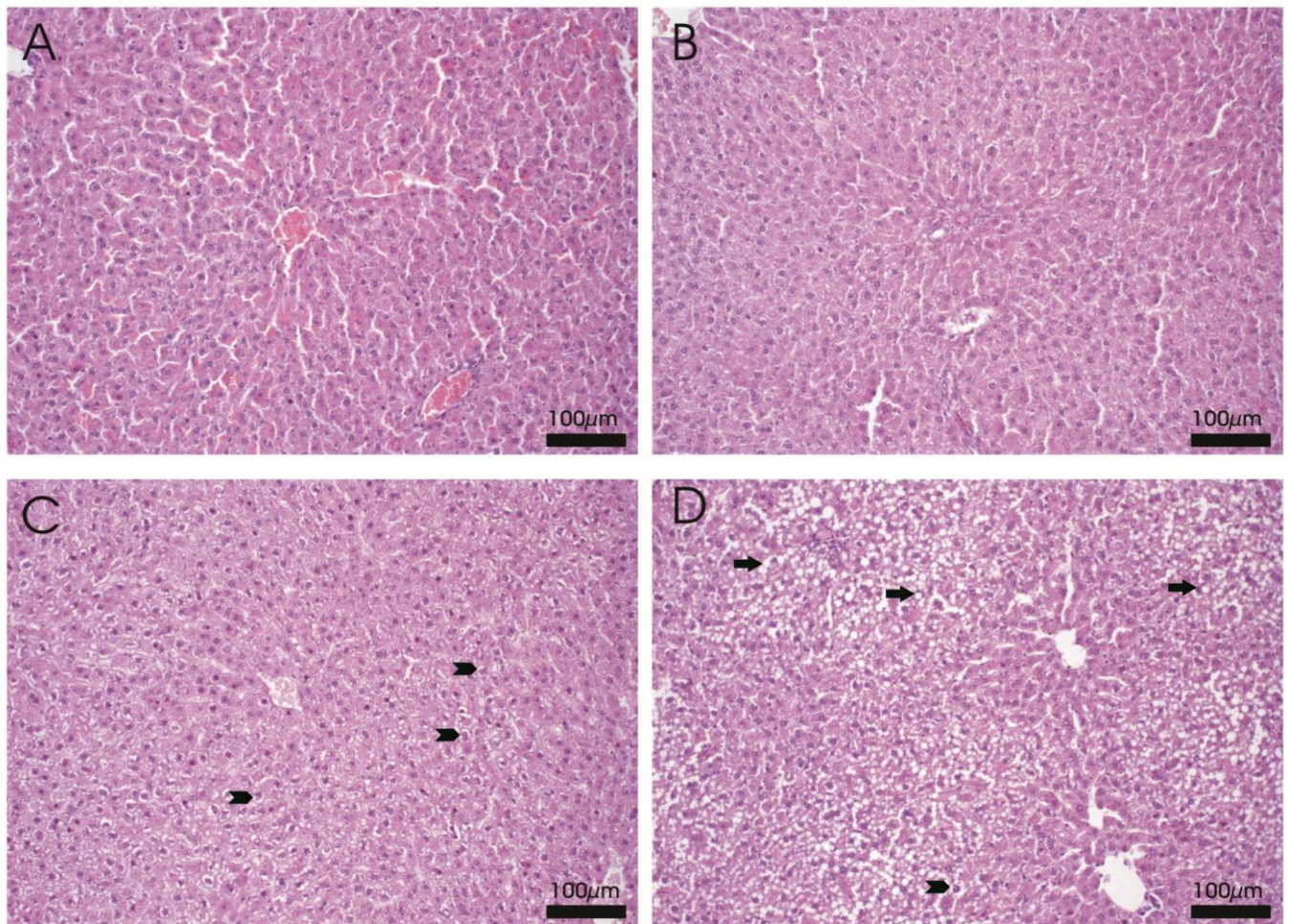


Figura 27 - Análise Histopatológica do fígado. **A)** Controle, **B)** Controle-Solvente, **C)** MTZ, **D)** MTZ-Cl. HE, 20x. Setas representam hepatócitos com degeneração hidrópica. Pontas de setas representam hepatócitos com esteatose.

5.5 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

No experimento de detecção de espécies reativas de oxigênio foi possível observar diferença na intensidade de liberação de radicais livres entre os grupos: controle, MTZ (0,027 μ M), MTZ (0,229 μ M) e MTZ-Cl (0,027 μ M). A intensidade foi mensurada a partir do nível de fluorescência liberada por cada um deles, como observado na figura 28. O grupo controle (A) representa a liberação basal de radicais livres pela célula do parasito. Nos grupos B e D foram utilizados a mesma concentração de MTZ e MTZ-Cl (0,027 μ M), onde observa-se uma grande diferença de intensidade de fluorescência. Após análise estatística tem-se que as células tratadas com MTZ-Cl liberaram uma quantidade duas vezes maior de radicais livres em comparação com as células tratadas com a mesma concentração de MTZ (Figura 29). Quando se compara a liberação de radicais livres nos diferentes valores de CI_{50} dos compostos, MTZ (0,229 μ M) e MTZ-Cl (0,027 μ M), têm-se um resultado semelhante entre eles, não apresentando diferença estatística nos valores representados no gráfico da Figura 29

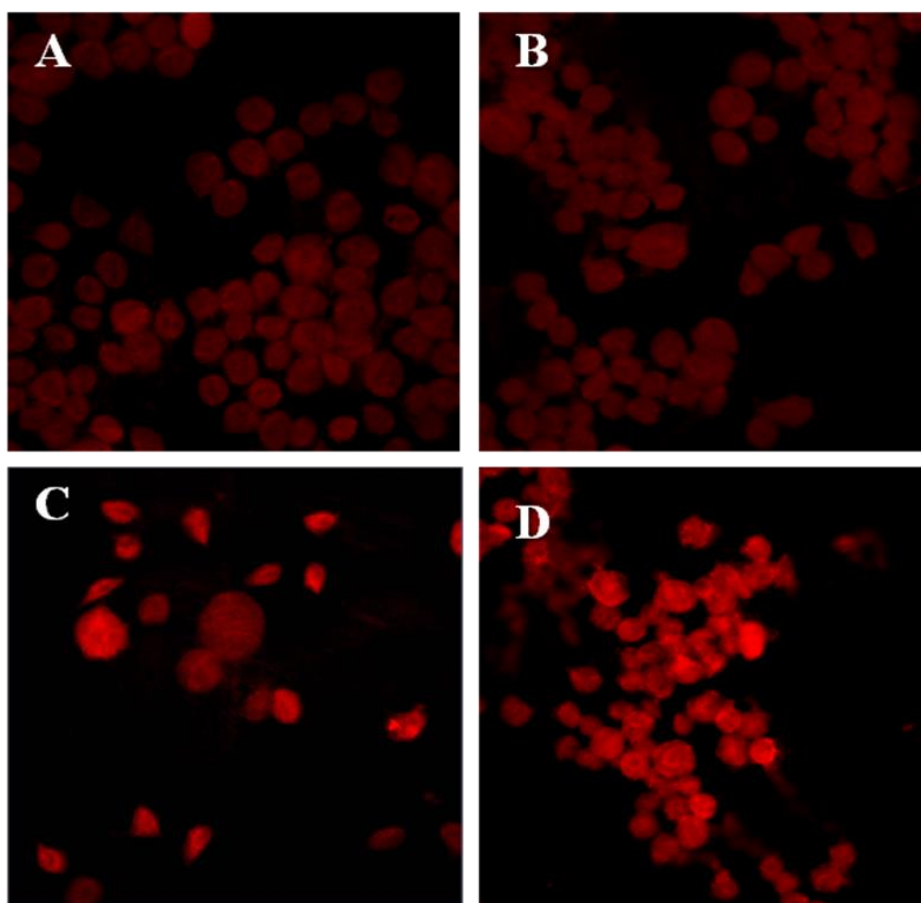


Figura 23- Detecção de radicais livres em *T. vaginalis*, cepa JT. **A)** controle, **B)** MTZ (0,027 μ M), **C)** MTZ (0,229 μ M) e **D)** MTZ-Cl (0,027 μ M). Sonda DHE, aumento de 63x.

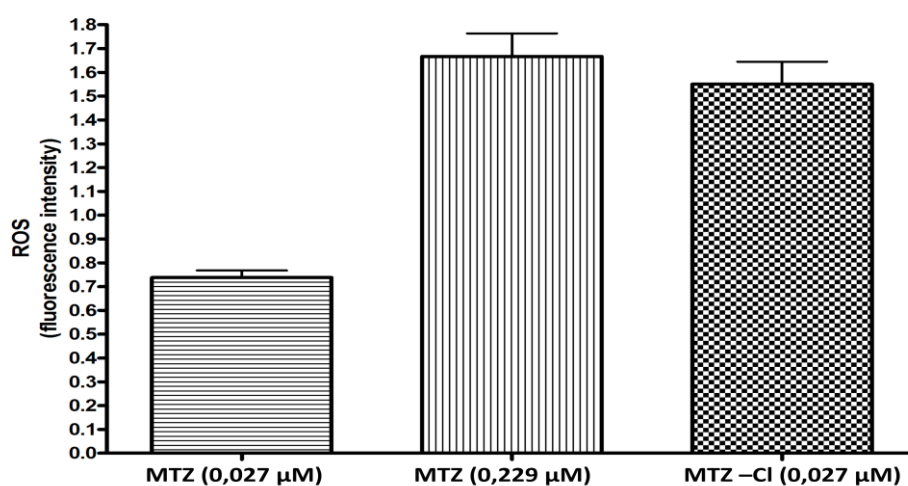


Figura 24- Gráfico de intensidade de fluorescência em células de *T. vaginalis* tratadas com MTZ e MTZ-Cl. Valores representados no gráfico foram normalizados de acordo com seus respectivos controles.

6 DISCUSSÃO

Infecções parasitárias representam uma grande ameaça à saúde em países subdesenvolvidos e tem um profundo impacto sobre a saúde pública (VIEIRA *et al.*, 2015). De acordo com a OMS, a tricomoníase é responsável por quase 50% de todas as DST's com cura em todo o mundo (ALVES *et al.*, 2011), prevalecendo sobre outras importantes infecções sexualmente transmissíveis como sífilis (3,5%), gonorréia (18,2%) e clamídia (27,1%) (ZIMMERMMANN *et al.*, 2008; CUDMORE & GARBER, 2010). Apesar da tricomoníase ser uma doença amplamente difundida pelo mundo, com fácil diagnóstico e tratamento, ainda é considerada negligenciada, pois uma pequena atenção tem sido voltada para tal enfermidade, revelando-se um problema cotidiano nas redes públicas de saúde (SCHWEBKE & BURGUESS, 2004).

O MTZ é considerado o antibiótico mais versátil na prática médica, estando na lista dos 100 medicamentos mais prescritos nos EUA (BENDESKY *et al.*, 2002; LOFMARK *et al.*, 2010). Ele é o antimicrobiano mais prescrito para o tratamento da tricomoníase, estando incluso dentre os medicamentos essenciais pela OMS (ALAWADI *et al.*, 2015). No entanto, sua larga utilização favorece o surgimento de cepas resistentes, levando a modificações no regime terapêutico, com adoções de tratamentos mais longos e com maiores quantidades do fármaco, potencializando assim seus efeitos adversos.

Um dos maiores problemas de saúde que a sociedade enfrenta, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, é o rápido aumento de micro-organismos resistentes e multirresistentes. Regimes de tratamento mal supervisionados e o uso quimioprolático de antimicrobianos vêm contribuindo para a ineficácia desses medicamentos via resistência dos micro-organismos (DUNNE *et al.*, 2003).

Casos de resistência a fármacos entre os protozoários têm sido um agravante principalmente levando em consideração as poucas opções terapêuticas disponíveis (ILLIÉ *et al.*, 2012). Relatos de resistência ao MTZ em *T. vaginalis* e também em *G. lamblia* têm sido documentados desde o século passado (UPCROFT, 1993; VOOLMANN, 1993).

O isolamento e desenvolvimento de novas substâncias visando possibilitar a diminuição de efeitos adversos provenientes da terapia convencional, além de aumentar o arsenal terapêutico e superar o surgimento de cepas resistentes, tornaram-se atividade de destaque no cenário mundial. Neste contexto, a relativa facilidade de manipulação das cadeias ligadas ao anel imidazólico do MTZ torna a pesquisa de seus análogos um campo atrativo e promissor (BUSATTI *et al.*, 2007).

O TNZ é um análogo estrutural do MTZ e é atualmente a segunda linha de tratamento da tricomoníase e uma alternativa no caso de pacientes refratários. Da mesma forma que o TNZ, fármacos com modificações estruturais mais potentes e não tóxicas devem ser desenvolvidas como opção terapêutica para parasitoses como a tricomoníase, pois o desenvolvimento e a obtenção de substâncias totalmente inéditas são muito mais difíceis e onerosas.

Estudos já demonstraram o potencial inibitório de vários derivados do MTZ sobre o crescimento de diferentes micro-organismos, tais como: *G. lamblia* (UPCROFT *et al.*, 2006; BUSATTI *et al.*, 2007; KHABNADIDEH *et al.*, 2011 e ALAWADI *et al.*, 2015), *E. histolytica* (GÓMEZ-ARROYO *et al.*, 2004; ABID *et al.*, 2008; SALAHUDDIN, *et al.*, 2012), *T. vaginalis* (UPCROFT *et al.*, 2006; ALAWADI *et al.*, 2015) e *Helicobacter pylori* (MOSHAFI *et al.*, 2011).

Após testes preliminares com alguns análogos do MTZ como o tosilado (MTZ-Ts), bromado (MTZ-Br), iodado (MTZ-I) e o fluorado (MTZ-F) (dados não mostrados), a destoante ação tricomonocida do análogo clorado (MTZ-Cl) indicou a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre essa substância.

A avaliação da atividade tricomonocida foi iniciada com a determinação da CI_{50} do MTZ frente às cepas JT (sensível ao MTZ) e CDC 085 (resistente ao MTZ) no intervalo de 24 e 48 horas.

Técnicas de análise descritiva e gráficos de dispersão foram utilizadas através dos quais foi observada a tendência da relação entre a concentração das substâncias e o percentual de inibição do crescimento de *T. vaginalis*. Estes resultados foram validados pela técnica de Análise de Regressão Linear Simples (WERKEMA & AGUIAR, 2006). Não foram encontrados *outliers* e os resíduos foram independentes e normalmente distribuídos,

indicando a adequação do modelo escolhido. Posto isto, estimou-se a CI_{50} das substâncias, bem como seu intervalo de confiança através de Regressão Inversa (WERKEMA & AGUIAR, 2006), considerando-se uma confiança de 90 e 95%.

O valor de CI_{50} encontrado para o MTZ sobre a cepa JT foi de 0,229 μM , variando de 0,139 a 0,380 μM , com 95% de confiança em 24 h. Já o seu valor encontrado em 48 h de exposição foi de 0,068 μM , variando de 0,032 a 0,147 com 95% de confiança. Neste caso, o valor estimado para CI_{50} em 24 h não está contido no valor estimado para 48 h, significando que o tempo é determinante na resposta do MTZ contra a cepa susceptível ao MTZ de *T. vaginalis*.

O valor de CI_{50} encontrado para o MTZ sobre a cepa CDC 085 foi de 1,18 μM variando de 0,83 a 1,68 μM com 95% de confiança em 24 h. Já o seu valor encontrado em 48 h de exposição foi de 0,49 μM , variando de 0,28 a 0,84 μM com 95% de confiança. Neste caso, o valor estimado para CI_{50} em 24 h não está contido no valor estimado para 48 h, significando que o tempo é também determinante na resposta do MTZ contra a cepa resistente ao MTZ de *T. vaginalis*.

O valor de CI_{50} do MTZ-Cl sobre a cepa JT, em 24 h, foi de 0,027 μM , variando de 0,015 a 0,046 μM com 95% de confiança. A CI_{50} encontrada em 48 h foi 0,006 μM , variando de 0,003 a 0,015 μM , com 95% de confiança. Também, neste caso, o valor estimado para CI_{50} em 24 h não está contido no valor estimado para 48 h, significando que, como o MTZ, a atividade do MTZ-Cl é influenciada pelo tempo de exposição à substância.

Estes resultados indicam que o MTZ, tanto para a cepa resistente como para a sensível, e o MTZ-Cl para a cepa sensível, são compostos dose e tempo dependentes, no entanto ressalta-se que essa maior ação ocorra até um ponto limite, onde após esse, a ação tricomonocida tende a se tornar constante. Neste contexto, a posologia a ser adotada deve levar em consideração as duas variáveis.

O valor de CI_{50} do MTZ-Cl sobre a cepa CDC 085 em 24 h foi de 0,27 μM variando de 0,12 a 0,58 μM com 95% de confiança. A CI_{50} encontrada em 48 h foi 0,24 μM , variando de 0,12 a 0,46 μM com 95% de confiança. Neste caso, o valor estimado para CI_{50} em 24 h está contido no valor estimado para 48 h, significando que, na avaliação da atividade do MTZ-Cl para CDC 085, o tempo de exposição não foi determinante. Neste caso, a diferença observada pode

ser explicada pela diferença na taxa de proliferação celular observada entre os trofozoítos da cepa CDC 085, que crescem mais lentamente quando comparada à cepa JT. A cepa CDC 085 por ser resistente, talvez possua uma via metabólica alternativa para a atividade da PFOR e por isso, um tempo maior de exposição não influenciaria na sua capacidade de ação. Outra possibilidade, diz respeito à capacidade de eliminação de oxigênio das diferentes cepas de *T. vaginalis*, principalmente as resistentes, que podem ser menos eficientes na eliminação de oxigênio, resultando em níveis residuais de O_2 que compete com o MTZ por elétrons, havendo assim menor ativação da substância com o tempo de exposição.

Contudo, avaliando a potência do análogo em estudo concluímos que os resultados obtidos foram bastante promissores. A atividade do MTZ-Cl foi cerca de onze vezes superior ao MTZ no intervalo de 24 h e oito vezes maior no tempo de 48 h, chegando ao valor de CI_{50} da ordem de nanomoles. O composto também apresentou boa atividade contra a cepa resistente, CDC 085, com atividade mais de quatro vezes superior no intervalo de 24 horas e duas vezes mais potente no intervalo de 48 h quando comparado aos resultados obtidos para o MTZ. Mas devemos aqui salientar que apesar da atividade do MTZ-Cl ter sido menos evidente sobre a cepa resistente, sua dose significativamente menor contribui positivamente para sua maior potência e menores efeitos adversos.

Refletindo sobre diferenças no mecanismo de ação das duas moléculas, precursor e derivado, atentamos para a estrutura das substâncias. O átomo de cloro adicionado à molécula de MTZ pode ter elevado o seu potencial de redução, ocorrendo maior ativação da droga e em consequência maior difusão da substância inativa para o citosol do parasito, como forma de restabelecimento de um equilíbrio entre substância ativa e seu pró-fármaco (BENCHIMOL, 2008). Outros estudos demonstraram que análogos 5-nitroimidazóis com cadeia lateral mais hidrofóbica têm sua atividade aumentada provavelmente devido ao aumento na permeabilidade celular desses compostos (BUSATTI *et al.*, 2007; ABID *et al.*, 2008). Desta forma uma explicação seria o influxo aumentado de MTZ-Cl no parasito, gerando além de maior quantidade de NO_2^- , maior quantidade de outros radicais livres. Neste contexto, avaliamos a formação de radicais livres citotóxicos nos trofozoítos tratados com a substância precursora e seu derivado. Observamos que os trofozoítos tratados com MTZ-Cl produziram significativamente maior quantidade de radicais livres. Estes resultados confirmam o alto potencial de redução do nosso derivado, que com uma quantidade onze vezes menor de moléculas foi capaz de produzir o mesmo efeito de seu precursor.

Considerando que o derivado em estudo mostrou-se altamente competitivo com o MTZ, avaliamos sua toxicidade já que se deve ressaltar que o desenvolvimento de novos fármacos vai além da atividade biológica e facilidade de obtenção da substância. Questões como toxicidade são imperativas para o direcionamento de uma substância para os ensaios clínicos (BUSATTI *et al.*, 2007). Células primárias, isoladas de tecidos, possuem muitas propriedades semelhantes a células normais *in vivo*, tornando possível a realização de ensaios de citotoxicidade específicos contra células de vários tecidos. A avaliação da citotoxicidade do MTZ foi realizada em estudos anteriores através de ensaio de proliferação em células mononucleares do sangue periférico humano, onde não foi observado efeito inibitório significativo (FONSECA *et al.*, 2012).

O novo composto foi avaliado quanto à citotoxicidade através do teste de MTT sobre culturas de células hepáticas denominadas SK-Hep. Na perspectiva de que o MTZ sofre metabolismo de primeira passagem no fígado, a linhagem de células hepáticas foi escolhida como um interessante modelo para a avaliação da citotoxicidade. O MTZ-Cl foi classificado como não citotóxico até a concentração máxima testada de 25,6 μM , concentração essa quase 100 vezes superior a maior CI_{50} encontrada nesse estudo para a molécula (CDC 085 - 24h: 0,27 μM) (Tabela 18), sinalizando o nível de segurança do mesmo em utilizações futuras. Achados semelhantes de baixa citotoxicidade com diferentes análogos do MTZ são descritos na literatura (GÓMEZ-ARROYO *et al.*, 2004; BUSATTI *et al.*, 2007; SALAHUDDIN *et al.*, 2012). Estes resultados demonstram que a alteração na cadeia lateral das moléculas do MTZ não interferiu na sua citotoxicidade.

Prosseguindo com a avaliação da toxicidade do MTZ-Cl, buscamos reforçar seu status de segurança, estimando sua toxicidade aguda. A toxicidade aguda oral refere-se aos efeitos adversos que ocorrem após a administração em dose única de uma determinada substância ou de várias doses em um prazo de 24 horas. Distúrbios no sistema nervoso já estão descritos na bula do MTZ e, devido ao maior caráter hidrofóbico do MTZ-Cl, este pode ter atravessado mais facilmente a barreira hematoencefálica causando maior duração da sonolência. No entanto, nenhuma alteração histopatológica foi observada no tecido nervoso dos animais, sugerindo que o efeito observado não o comprometeu. A análise histopatológica demonstrou apenas discretas alterações hepáticas nos grupos que receberam MTZ e MTZ-Cl (2 g/Kg). Hepatotoxicidade induzida por MTZ é sugerida na literatura, no entanto parece ser questionável como um único agente etiológico, dada a raridade de casos reportados e sua extensa utilização

em todo o mundo (HUSSEIN *et al.*, 2011). Além disso, levando em consideração que o MTZ-Cl apresenta atividade superior ao MTZ, certamente uma menor dose será necessária para o tratamento e consequentemente a toxicidade será ainda menor.

Efeitos tóxicos dos fármacos são normalmente proporcionais a sua concentração no organismo e a duração de exposição. Doses excessivas de fármacos podem levar à quadros de toxicidade dose-dependente. Deve-se considerar que a dose utilizada durante o teste, 2 g/Kg, foi 70 vezes maior que a dose de MTZ preconizada para o tratamento da tricomoníase (dose única de 2 g para o peso médio de 70 Kg), e ao extrapolar essa análise para o MTZ-Cl, conclui-se que a dose utilizada foi ainda mais destoante já que se trata de uma molécula com maior potência

Apesar das elevadas doses utilizadas nenhuma morte ocorreu entre os animais e por isso não se pode obter a DL_{50} e nem uma possível simulação de um índice terapêutico seguro para o MTZ-Cl, mas já se pode especular que as concentrações potencialmente tóxicas do derivado excedam em muito as suas concentrações terapêuticas. Conclui-se que o uso clínico do novo análogo como agente tricomonicida é provavelmente seguro.

7 CONCLUSÃO

- O MTZ-Cl apresentou atividade contra cepa sensível e resistente de *T. vaginalis*;
- A atividade de MTZ-Cl foi superior a do MTZ para ambas as cepas. Para a cepa sensível ao MTZ, a superioridade chegou a onze vezes, alcançando a CI_{50} em quantitativos nanomoles; e para a cepa resistente ao MTZ, a superioridade foi de até quatro vezes em relação ao MTZ;
- O tempo de exposição da cultura de *T. vaginalis* sobre MTZ-Cl foi significativo para a quantificação dos valores de CI_{50} para a cepa sensível ao MTZ e não foi significativo para a cepa resistente;
- O maior caráter hidrofóbico e o de potencial de redução do análogo são, provavelmente, fatores determinantes para a eficiência desta molécula como agente tricomonicida;
- O MTZ-Cl estimulou uma maior produção de radicais livres na célula do parasito;
- O MTZ-Cl foi classificado como não citotóxico em ensaios *in vitro* e *in vivo*, sinalizando que as concentrações potencialmente tóxicas excedam as concentrações terapêuticas;
- O grande potencial tricomonicida apresentado pelo análogo clorado poderá favorecer uma maior adesão durante o tratamento da tricomoníase, já que, utilizando tal molécula em menor concentração, os efeitos adversos produzidos poderão ser menos expressivos e os casos de resistência possivelmente reduzidos;
- O fato do análogo testado ser derivado de um fármaco bem estabelecido no mercado mundial e apresentar baixa toxicidade sobre células humanas evidenciam um elevado grau segurança para utilizações futuras na pesquisa clínica.

8 REFERÊNCIAS

- ABID, M. *et al.* Synthesis and antiamoebic activity of metronidazole thiosemicarbazone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n.9, p. 2035–2039, 2008.
- ADEGBAJU, A., MORENIKEJI, O. A. Cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. **Scientific Research and Essays**, v. 3, n.4, p. 132-138, 2008.
- ALAWADI, D.Y. Metronidazole derivatives as a new class of antiparasitic agents: synthesis, prediction of biological activity, and molecular properties. **Medicinal Chemistry Research**, n. 24, p.1196–1209, 2015.
- ALMEIDA, M.S. *et al.* Tricomoníase: prevalência no gênero feminino em Sergipe no biênio 2004-2005. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, n. 1, p.1417-1421, 2010.
- ALVES, M.J. *et al.* Epidemiologia de *Trichomonas vaginalis* em mulheres. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 29, n.1, p.27-34, 2011.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. The Transfer of Drugs and Other Chemicals Into Human Milk. **Pediatrics**, v. 108, n. 3, 2001.
- ANDREA, S. B.; CHAPIN, K.C. Comparison of Aptima *Trichomonas vaginalis* Transcription-Mediated Amplification Assay and BD Affirm VPIII for Detection of *T. vaginalis* in Symptomatic Women: Performance Parameters and Epidemiological Implications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 866–869, 2011.
- BACHMANN, L.H. *et al.* *Trichomonas vaginalis* Genital Infections: Progress and Challenges. **Oxford University**, v.53, n.3, p.160-172, 2011.
- BARROS, S. M. O. Doenças Infecciosas e Infecções Congênitas. In: BARROS, S. M. O; MARIN, H. F; ABRAÃO, A. C. **Enfermagem Obstétrica e Ginecológica: Guia para a Prática Assistencial**. São Paulo: Roca, cap.9, p.161-185, 2002.
- BENCHIMOL, M. The Hydrogenosome as a Drug Target. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 9, 2008.

BENDESKY, A. *et al.* Is metronidazole carcinogenic? **Mutation Research-reviews In Mutation Research**, v.511, n.2, p.133-144, 2002.

BRAVO, R.S; GIRALDO, P.C; CARVALHO, N.S; GABIATTI, J.R; VAL, I.C.C; GIRALDO, L.P.D; PASSOS, M.D.L. Tricomoniase Vaginal: o que se Passa? **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 2, p. 73-80, 2010.

BROWN, H.L. *et al.*, Clinical evaluation of Affirm VPIII in the detection and identification of *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, and *Candida* species in vaginitis/vaginosis. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v.12, p.17-21, 2004.

BUNBURY, N. *et al.* Comparison of the InPouch TF Culture System and Wet-Mount Microscopy for Diagnosis of *Trichomonas gallinae* Infections in the Pink Pigeon *Columba mayeri*. **Journal of Clinical Microbiolgy**, v.43, n.2, p.1005, 2005.

BUSATTI, H.G.N.O. *et al.* Effect of metronidazole analogues on *Giardia lamblia* cultures. **Parasitology Research**, v. 102, p. 145-149, 2007.

CAMPBELL, L. *et al.* Evaluation of the OSOM *Trichomonas* Rapid Test versus Wet Preparation Examination for Detection of *Trichomonas vaginalis* Vaginitis in Specimens from Women with a Low Prevalence of Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 10, p. 3467–3469, 2008.

CARO-PATÓN *et al.* Is metronidazole teratogenic? A meta-analysis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, n. 44, p. 179-182, 1997.

CARVALHO, M.G.; SILVA, M.B.S. Hematologia: técnicas laboratoriais e interpretação. **Imprensa Universitária**, p.139, 1988.

CDC. Incidence, Prevalence, and Cost of Sexually Transmitted Infections in the United States. CDC Fact Sheet- National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, 2013

CDC. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines: Trichomoniasis. Centers for Disease Control and Prevention, 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/std/tg2015/trichomoniasis.htm>>. Acesso em: 02 fevereiro de 2016.

CHAUDHARI, H. S.; SINGH, P. P. Comparative drug susceptibility study of five clonal strains of *Trichomonas vaginalis* in vitro. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.50-53, 2011.

CHUNG, M.C. *et al.* Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.2, p. 155-180, 2005.

CLARK, C.G.; DIAMOND, L.S. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n. 3, p. 329–341, 2002.

COLEMAN, J. S. *et al.* *Trichomonas vaginalis* Vaginitis in Obstetrics and Gynecology Practice: New Concepts and Controversies. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 68, n.1, p.43–50, 2013.

CONNOR, T. H. *et al.* The Contribution of Metronidazole and Two Metabolites to the Mutagenic Activity Detected in Urine of Treated Humans and Mice. **Cancer Research** n. 37, p. 629-633, 1977.

CROWELL, A. L. *et al.* In Vitro Metronidazole and Tinidazole Activities against Metronidazole-Resistant Strains of *Trichomonas vaginalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n.4, p. 1407–1409, 2003.

CUDMORE, S. L. *et al.* Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.4, p. 783-793, 2004.

CUDMORE, S. L.; GARBER, G.E. Prevention or treatment: The benefits of *Trichomonas vaginalis* vaccine. **Journal of Infection and Public Health**, v. 3, p. 47-53, 2010.

DRAPER, D. *et al.* Detection of *Trichomonas vaginalis* in Pregnant Women with the InPouch TV Culture System. **Journal of Clinical Microbiolgy**, v. 31, n.4, p.1016, 1993.

DUNNE, L. R. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas Vaginalis*. **Cell Research**, v. 13, n.4, p.239-249, 2003.

EVALDSON, G. R. *et al.* Tinidazole milk excretion and pharmacokinetics in lactating women. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 19, p. 503-507, 1985.

FEITTOSA, C. F.; CONSOLARO, M. E. L. Tricomoniase: aspectos gerais e diagnóstico pela colpocitologia de Papanicolaou. **Arquivo de Ciência e Saúde da Unipar**, v. 9, n. 3, p. 199-206, 2005.

FONSECA, T.H.S. **Avaliação “in vitro” do potencial amebicida de extratos brutos e triterpenos obtidos a partir de *Maytenus gonoclada* (Celastraceae), sobre *Entamoeba histolytica***. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, Belo Horizonte, 2012.

FUNG, H. B.; DOAN, T. L. *et al.* Tinidazole: A Nitroimidazole Antiprotozoal Agent. **Clinical Therapeutics**, v. 27, n, 12, p. 1859-1882, 2005.

GARBER, G.E.; LEMCHUK-FAVEL, L.T. Association of Production of Cell Detaching Factor with the Clinical Presentation of *Trichomonas vaginalis*. **Journal of clinical microbiology**, v.28, n.11, p. 2415-2417, 1990.

GEHRIG, S.; EFFERTH, T. Development of Drug Resistance in *Trichomonas vaginalis* and its Overcoming with Natural Products. **The Open Bioactive Compounds Journal**, v. 2, p. 21-28, 2009.

GÓMEZ-ARROYO, S. *et al.* Cytogenetic study of metronidazole and three metronidazole analogues in cultured human lymphocytes with and without metabolic activation. **Toxicology in Vitro**, v.18, p. 319–324, 2004.

GRAY, M. G. *et al.* Further Observations on Metronidazole (Flagyl). **The British Journal of Venereal Diseases**, n. 37, p. 278-279, 1961.

HARP, D.F.; CHOWDHURY, I. Trichomoniasis: evaluation to execution. **European Journal Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.157, n.1, p.3-9, 2011.

HOLLMAN, D. *et al.* Screening for *Trichomonas vaginalis* in High-risk Adolescent Females with a New Transcription-mediated Nucleic Acid Amplification Test (NAAT): Associations with Ethnicity, Symptoms, and Prior and Current STIs. **Journal of Pediatric & Adolescent Gynecology**, v. 23, p312-316, 2010.

HUPPERT, J.S. Trichomoniasis in teens: an update. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v.21, p.371–378, 2009.

HUSSEIN, R. *et al.* Severe hepatotoxicity associated with the combination of spiramycin plus metronidazole. **Arab Journal of Gastroenterology**, v.12, p. 44–47, 2011.

ILLIÉ, K. *et al.* Social-economic factors and irrational antibiotic use as reasons for antibiotic resistance of bacteria causing common childhood infections in primary healthcare. **European Journal Pediatrics**, v. 171, p.767–777, 2012.

JESUS, J. B.; SILVA, F. C. F. Tricomoníase urogenital humana. In: **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Ed. José Rodrigues Coura. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 757 a 769, 2005.

KHABNADIDEHA, S. *et al.* Antigiardia Effects of New Metronidazole Derivatives on Trophozoites in TYI-S-33. **IJPS Summer**, v. 7, n.3, p. 181-184, 2011.

KENYON *et al.* Classification of incidence and prevalence of certain sexually transmitted infections by world regions. **International Journal of Infectious Diseases**, n.18, p. 73–80, 2014.

KIM *et al.* Non-thermal dielectric-barrier discharge plasma damages human keratinocytes by inducing oxidative stress. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 37, p. 29-38, 2016.

KIRKCALDY, R. D. *et al.* *Trichomonas vaginalis* Antimicrobial Drug Resistance in 6 US Cities, STD Surveillance Network, 2009–2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, 2012.

KISSINGER, P. *et al.* *Trichomonas Vaginalis* Treatment Reduces Vaginal HIV-1 Shedding. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 36, n. 1, p.11–16, 2009.

KISSINGER, P. & ADAMSKI, A. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. **Sexually Transmitted Infectious**, v. 89, n.6, p. 426–433, 2013.

KISSINGER, P. Epidemiology and Treatment of Trichomoniasis. **Current Infectious Disease Reports** , v.17, n.31, 2015 (1).

KISSINGER, P. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. **BMC Infectious Diseases**, v.15, n. 307, p. 1-8, 2015 (2).

KOCK, M. *et al* . Detection of *Trichomonas vaginalis* in HIV positive women in pretoria, South Africa. **Sexually Transmitted Infectious**, v. 87, p. A301, 2011.

KOSS, C.A. *et al.* Investigation of Metronidazole Use during Pregnancy and Adverse Birth Outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4800–4805, 2012.

LACTMED. Toxicology Data Network, U.S., 2015. Disponível em: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~I0JwW2:1>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2016.

LAGA, M. *et al.* Condom promotion, sexually transmitted diseases treatment, and declining incidence of HIV-1 infection in female Zairian sex workers. **The Lancet**, v. 344, p.246–8, 1994.

LANDI *et al.* Loss of Multiple Hydrogenosomal Proteins Associated with Organelle Metabolism and High-Level Drug Resistance in Trichomonads. **Experimental Parasitology**, n. 97, p. 102–110, 2001.

LEITSCH, D. *et al.* *Trichomonas vaginalis* Flavin Reductase 1 and its Role in Metronidazole Resistance. **Molecular Microbiology**, v.91, n1,p. 198–208, 2015.

LEVI, M.H. *et al.* Comparison of the InPouch TV Culture System and Diamond's Modified Medium for Detection of *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.1. 35, n. 12, p. 3308–3310, 1997.

LI, H. K. *et al.* The Syntheses and Crystal Structures of Metronidazole-derived. **Journal of Chemical Crystallography**, v.38, p.461–466, 2008.

LÖFMARK, S. *et al.* Metronidazole is Still the Drug of Choice for Treatment of Anaerobic Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n.1, p.16–23, 2010.

MACIEL, G.P. *et al.* Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n.3, p.152-160, 2004.

MAHDI, N.K. *et al.* Alternative drugs against *Trichomonas vaginalis*. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v.12, n.5, p. 674-689, 2006.

MALLA, N. *et al.* Human Trichomoniasis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.19, n.1, p.6-13, 2001.

MANN, J.R *et al.* Treatment of trichomoniasis in pregnancy and preterm birth: an observational study. **Journal Womens Health (Larchmt)**, v. 18, n.4, p. 493-7, 2009.

McCLELLAND *et al.* Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. **Journal Infectious Diseases**, v.195, p.698–702, 2007.

MEITES, E. *et al.* *Trichomonas vaginalis* in selected U.S. sexually transmitted disease clinics: testing, screening, and prevalence. **Sexually Transmitted Diseases**, n.40, v.11, p. 865–869, 2013.

MIRANDA, A.E *et al.* *Trichomonas vaginalis* infection among young pregnant women in Brazil. **Brazilian Journal Infection Diseases**, v.18, n.6, p. 669–671, 2014.

MOSHAFI, M.H. *et al.* 5-Nitroimidazole-based 1,3,4-thiadiazoles: heterocyclic analogs of metronidazole as anti-*Helicobacter pylori* agents. **Arch Pharm (Weinheim)**, v.344, n.3, p.178-83, 2011.

MUNDODI, V. *et al.* Silencing the ap65 gene reduces adherence to vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. **Molecular Microbiology**, v.53, n.4, p.1099-108, 2004.

NARCISI, E.M.; SECOR, W.E. In Vitro Effect of Tinidazole and Furazolidone on Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 40, n.5, p. 1121–1125, 1996.

NWEZE, E.I.; MOUNEKE, G.N.; *Trichomonas vaginalis* in HIV/AIDS subjects in Nigeria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. v. 1, n. 4, p. 282-286. 2011.

NYE, M.B. *et al.* Comparison of APTIMA *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, 2009.

OMS. **Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, syphilis and *Trichomonas vaginalis***: methods and results used by WHO to generate 2005 estimates. World Health Organization 2011.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity/Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 129. Guidance Document On Using Cytotoxicity Tests To Estimate Starting Doses For Acute Oral Systemic Toxicity Tests, Paris 2010.

OWUSU-EDUSEI, K. *et al.* The estimated direct medical cost of selected sexually transmitted infections in the United States, 2008. **Sexual Transmitted Diseases**, n.40, v.3, p.197-201, 2013.

PASSOS, M.R.L. *et al.* Há aumento de dst no carnaval? Série temporal de diagnósticos em uma clínica de DST. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.56, n.4, p. 420-427, 2010.

PETRIN, D. Clinical and Microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 300-317, 1998.

PRICE, M.A. *et al.* Addition of treatment for trichomoniasis to Syndromic Management of urethritis in Malawi:A randomized clinical trial. **Sexually Transmitted Diseases**, v.30, n.6, p. 522, 2003.

QUINLIVAN, E.B. *et al.*, Modeling the Impact of *Trichomonas vaginalis* Infection on HIV Transmission in HIV-Infected Individuals in Medical Care. **Sexually Transmitted Diseases**, v.39, n. 9, 2012.

RABIEE, S. *et al.* Comparison of Resistant and Susceptible Strains of *Trichomons vaginalis* to Metronidazole Using PCR Method. **Iranian Journal Parasitol**, v. 7, n.3, p.24-30, 2012.

RAMOS, I.S. *et al.* Estudio de la susceptibilidad al metronidazol em aislamientos cubanos de *Trichomonas vaginalis*. **Revista Cubana de Obstetricia y Ginecologia**, v.37, n.2, p.271-276, 2011.

SALAHUDDIN, A. Metronidazole thiosalicylate conjugates: Synthesis, crystal structure, docking studies and antiamoebic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, n. 22, p. 5694–5699, 2012.

SATTERWHITE, C.L. *et al.* Sexually transmitted infections among U.S. women and men: Prevalence and incidence estimates, 2008. **Sexually Transmitted Diseases**, n.40, v.3, p.187-193, 2013.

SCHWEBKE, J.R. Update of trichomoniasis. **Sexually Transmitted Infections**, v.78, p.378–379, 2002.

SCHWEBKE, J.R.; LAWING,L.F. Improved Detection by DNA Amplification of *Trichomonas vaginalis* in Males. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n.10, p. 3681–3683, 2002.

SCHWEBKE, J. R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 794-803, 2004.

SCHWEBKE, J.R.; BARRIENTES, F.J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* Isolates with Resistance to Metronidazole and Tinidazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.50, n.12, p. 4209–4210, 2006.

SILVER, B.J. *et al.* *Trichomonas vaginalis* as a Cause of Perinatal Morbidity: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 41, n. 6, p.369–376, 2014.

SIMHAN, H.N. *et al.* Elevated vaginal pH and neutrophils are associated strongly with early spontaneous preterm birth. **American Journal of Obstetrics and Gynecolog**, v. 189, n.4, 2003.

SIMHAN, H.N.*et al.* The vaginal inflammatory milieu and the risk of early premature preterm rupture of membranes. **American Journal of Obstetrics and Gynecolog**, v. 192, p. 213-218, 2005.

SIMHAN, H.N. *et al.* Host immune consequences of asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection in pregnancy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 196, n. 59, p. 59.e1-59.e5, 2007.

SIMMS-CENDAN, J. S. Metronidazole. **Infectious Diseases Update**, v. 3, n. 5, p. 153-156, 1996.

SNIPES, N. J. Molecular Epidemiology of Metronidazole Resistance in a Population of *Trichomonas vaginalis* Clinical Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 3004–3009, 2000.

SOBEL, J. D. *et al.* Tinidazole Therapy for Metronidazole-Resistant Vaginal Trichomoniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p.1341–1346, 2001.

SOOD, S. *et al.* InPouch TV™ culture for detection of *Trichomonas vaginalis*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 125, p. 567-571, 2007.

SOPER, D. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, n. 190, p. 281- 290, 2004.

SORVILLO, F. *et al.* *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 927-932, 2001.

STRINGER *et al.* Treatment of trichomoniasis in pregnancy in sub-Saharan Africa does not be associated with low birth weight or preterm birth. **South African Medical Journal**, v. 100, n. 1, p. 58-64, 2010.

UPCROFT, J. A. & UPCROFT, P. Drug resistance and *Giardia*. **Parasitology Today**, v. 9, p. 187-190, 1993.

UPCROFT, P. & UPCROFT, J. A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.1, p. 1-15, 2001.

UPCROFT, J.A; *et al.* 5-Nitroimidazole Drugs Effective against Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. 344–347, 2006.

VOOLMANN, T. & BOREHAM P.F.L. Metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis* in Brisbane. **Medical Journal of Australia**, v. 159, p. 490, 1993.

ZIMMERMMANN, J. B. *et al.* A multiplicidade do Papilomavírus humano na cérvix uterina de pacientes portadoras do vírus da imunodeficiência humana e sua interação na neoplasia intra-epitelial cervical. **HU Revista**, v.34, n.3, p. 161-66, 2008.

ZORATI, G.C.; MELLO, S.A. Incidência da tricomoníase em mulheres atendidas pelo sistema único de saúde em cascavel e no oeste do Paraná. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. Umuarama, v.13, n.2, p. 133-138, 2009.

WANG, C.C. *et al.* The effect of treatment of vaginal infections on shedding of human immunodeficiency virus type 1. **The Journal of Infectious Diseases**, v.183, p.1017–1022, 2001.

WERKEMA, M.C.C.; AGUIAR, S. **Análise de regressão: como entender o relacionamento entre as variáveis de um processo**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1.ed, 306pp, 2006.