

Análise Antimicobacteriana e Citotóxica *in vitro* de Análogos à Esfingosina-1-Fosfato frente ao *Mycobacterium Tuberculosis*

In vitro Antimycobacterial and Cytotoxic Analysis of Sphingosine-1-Phosphate Analogs against *Mycobacterium Tuberculosis*

Anna Cecília Xavier da Silva^{1,2}, Giovanna Gabriela Pedroza Rodrigues^{2,3}, Danielle Martiniano da Silva Rodrigues^{2,3}, Renata Inglez de Souza Tejo², Esther Del Olmo⁴, Samara Alves da Rocha Nascimento Alcantara^{1,2}, LÍlian Maria Lapa Montenegro Pimentel² e Luanna de Ângelis Correia de Sousa^{2,3}

1. Centro Universitário Maurício de Nassau (UNINASSAU), Aracaju, SE. 2. Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz, PE. 3. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). 4. Universidade de Salamanca, Espanha.

annaceci.xavier@gmail.com

Palavras-chave

Novas drogas
Tratamento de tuberculose

Keywords

New drugs
Tuberculosis treatment

Resumo:

O presente estudo avalia a atividade antimicobacteriana e citotóxica *in vitro* de dois compostos, análogos à esfingosina-1-fosfato, frente aos valores de Concentração Inibitória Mínima, Determinação de Citotoxicidade e Índice de Seletividade contra a cepa H37Ra de tuberculose, na condição de potencial alternativa para otimizar o tratamento da doença.

Abstract:

The present study evaluates the *in vitro* antimycobacterial and cytotoxic activity of two compounds, analogous to sphingosine-1-phosphate, in relation to the values of Minimum Inhibitory Concentration, Cytotoxicity Determination and Selectivity Index against the H37Ra strain of tuberculosis, as a potential alternative to optimize the treatment of the disease.

Artigo recebido em: 08.12.2024.

Aprovado para publicação em: 31.01.2025.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa negligenciada que continua sendo um problema de saúde pública global, sobretudo no Brasil, um dos países com maior carga da doença (OMS, 2021). Embora existam programas governamentais dedicados à erradicação da tuberculose, a busca por inovações e estratégias aprimoradas no tratamento da patologia ainda é necessária.

Nesse contexto, a pesquisa científica atual está explorando diversas abordagens, voltadas para o desenvolvimento de novos compostos que possam auxiliar na erradicação global da doença.

A tuberculose é provocada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), um bacilo intracelular facultativo, que afeta tipicamente os pulmões, com ciclo de reprodução e infecção em macrófagos do hospedeiro. Atualmente, são utilizados 4 medicamentos no tratamento da tuberculose: rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, por um período de 6 meses (BRASIL, 2021).

No entanto, apesar de dispor de tratamento eficaz, a crescente ineficiência dos fármacos está relacionada com o desgastante esquema terapêutico, que apresenta alta toxicidade, devido às interações entre os compostos e, baixa aceitação por parte dos pacientes, causando assim, o aumento de cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* e a necessidade do desenvolvimento de novas drogas capazes de otimizar o tratamento.

A esfingosina-1-fosfato é um importante esfingolípido, que apresenta grande relevância no controle da infecção micobacteriana em macrófagos (NADELLA, et. al., 2020). Diante disso, os derivados da esfingosina-1-fosfato são lipídios sinalizadores capazes de regular funções celulares importantes e promover respostas imunes mais eficazes, função promissora perante à forma de infecção do *Mycobacterium tuberculosis*.

Desta forma, o presente estudo buscou analisar o potencial antimicobacteriano e citotóxico *in vitro* de compostos inéditos, análogos à esfingosina-1-fosfato, frente à cepa de tuberculose.

METODOLOGIA

Síntese, comprovação estrutural e caracterização dos compostos: Os análogos à esfingosina-1-fosfato foram sintetizados e caracterizados na Universidade de Salamanca, na Espanha e enviados ao Laboratório de Imunoepidemiologia, na Fiocruz Pernambuco, para análise biológica *in vitro*.

Microorganismo: A cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177) será utilizada como cepa de referência da American Type Culture Collection, classificada como cepa sensível a todas às drogas utilizadas no tratamento da tuberculose com perfil avirulenta.

Determinação da Citotoxicidade (CC50): Foi utilizada a linhagem celular ATCC J774A.1, ajustada na concentração de 1.10^5 célula/poço em placa de 96 poços, para a realização do ensaio de MTT (MOSMANN, 1983).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC): A determinação da atividade dos compostos foi realizada pelo método colorimétrico de microdiluição em placas de 96 poços (PALOMINO, et. al., 2002).

Índice de Seletividade (IS): O IS pode ser obtido, dividindo-se a CC_{50} pelo MIC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) consiste na menor quantidade de um composto necessária para inibir completamente o crescimento de um microrganismo, sendo valores abaixo de $8\mu\text{g/ml}$, já considerados promissores (ANDREWS, 2001).

Nessa conjuntura, foram realizados ensaios para avaliar o MIC dos análogos inéditos à esfingosina-1-fosfato, aqui nomeados de AFJ, frente à cepa H37Ra de tuberculose. Os resultados de inibição micobacteriana dos compostos variaram de $128\mu\text{g/ml}$ a $8\mu\text{g/ml}$, onde os AFJ 18 e AFJ 21 se destacaram por alcançarem MIC de $8\mu\text{g/ml}$.

Dando continuidade à avaliação *in vitro* dos compostos, os AFJ's com menor MIC (AFJ 18 e AFJ 21) foram selecionados para o ensaio de avaliação citotóxica em linhagem celular de macrófagos de murinos. A viabilidade celular dos AFJ's variou de 1,97% a 99,99% de células vivas dependendo da concentração.

Ambos os compostos se destacaram por alcançarem viabilidade celular de 80% a partir de $2\mu\text{g/ml}$. A citotoxicidade (CC50) é um parâmetro utilizado para avaliar a capacidade tóxica de um composto a nível celular, ou seja, a dose capaz de manter a maior quantidade de células vivas (ISO, 2009).

Nesse contexto, o índice de seletividade (IS) também deve ser analisado quando falamos da atividade farmacológica de um composto, uma vez que é capaz de medir o quanto um composto é ativo contra o patógeno sem causar danos à viabilidade das células hospedeiras.

Portanto, quanto maior a razão entre a CC50 e o MIC, mais seletiva é a droga perante o bacilo e, conseqüentemente, menor será o efeito tóxico sobre as células (RIBEIRO, et. al., 2014). Dessa forma, realizamos o IS dos AFJ 18 e AFJ 21, onde verificamos resultado de 0,250 para ambos.

Um composto com $IS > 10$ é considerado mais seletivo contra um bacilo (UC-CACHÓN et al., 2014). No entanto, apesar dos IS dos AFJ's serem menores que 10, foi possível observar, a partir dos ensaios realizados, que os compostos apresentaram atividade contra a H37Ra, assim como viabilidade celular de até 99,99% dependendo da concentração.

Dessa forma, mudanças na formulação química dos compostos ainda podem ser realizadas a fim de potencializar a atividade seletiva.

Tabela 1. Resultados da análise antimicobacteriana dos compostos.

Compostos	MIC H37Ra µg/mL	CC50 J774A.1 µg/mL	IS
AFJ 18	8	2	0,250
AFJ 21	8	2	0,250

Fonte: Autores, 2024.

Legenda - MIC: Concentração inibitória Mínima; CC50: Citotoxicidade; IS: Índice de Seletividade.

CONCLUSÕES

Logo, a partir dos resultados encontrados nesta pesquisa, podemos inferir que, apesar dos resultados dos índices de seletividade dos compostos inéditos, análogos à esfingosina-1-fosfato, estarem abaixo do esperado, os AFJ's se mostraram promissores, pois, apresentaram atividade contra a cepa de tuberculose e mantiveram a viabilidade celular acima de 50%.

Os ensaios de avaliação de novos compostos são um desafio, devido ao ineditismo da análise, no entanto, resultados promissores como os expressos neste estudo são justificativas para a continuidade da pesquisa. Desta forma, modificações na estrutura química destes compostos podem ser realizadas a fim de potencializar a atividade dos AFJ's, para que assim, possamos dar continuidade aos testes biológicos destes compostos contra o *Mycobacterium tuberculosis*.

FINANCIAMENTO: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

AGRADECIMENTOS: Ao Laboratório de Imunoepidemiologia do Instituto Aggeu Magalhães, na Fio-cruz Pernambuco, por fornecer os meios necessários ao meu desenvolvimento enquanto jovem pesquisadora encantada pela ciência. À minha orientadora Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel e às minhas referências científicas Luanna de Ângelis Correia de Sousa e Giovanna Gabriela Pedroza Rodrigues por toda orientação, paciência e brilhantismo durante a construção do presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Oxford**, v. 48 suppl. S1, p. 5-16, 2001.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico de Tuberculose**, mar. 2021.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Biological evaluation of medical devices”. **Tests for cytotoxicity: in vitro methods**, ISO 10993-5, 2009.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, 1983.
- NADELLA, V. et al. Sphingosine-1-Phosphate (S-1P) Promotes Differentiation of Naive Macrophages and Enhances Protective Immunity Against Mycobacterium tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, jan. 2020.
- OMS. Organização Mundial da Saúde: Relatório Global de Tuberculose 2021. RIBEIRO, T. et al. Learning Delayed Influences of Biological Systems. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. 2:81; 2014.
- UC-CACHÓN, Andrés Humberto et al. Naphthoquinones isolated from Diospyros anisandra exhibit potent activity against pan-resistant first-line drugs Mycobacterium tuberculosis strains. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, 2014.

