

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

*Adenosina deaminase em *Trichomonas vaginalis*:*  
estudo da localização celular e do efeito de nutrientes essenciais

MURIEL PRIMON DE BARROS

PORTO ALEGRE, 2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Adenosina deaminase em *Trichomonas vaginalis*:  
estudo da localização celular e do efeito de nutrientes essenciais

Dissertação apresentada por  
**Muriel Primon de Barros** para a obtenção do GRAU  
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Tiana Tasca

PORTO ALEGRE, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.03.2013 pela banca examinadora constituída por:

Profa Dr. Andréia Buffon

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa Dr. Adriana Simon Coitinho

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa Dr. Ana Maria Oliveira Battastini

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Barros, Muriel Primon de  
Adenosina deaminase em *Trichomonas vaginalis*:  
estudo da localização celular e do efeito de  
nutrientes essenciais / Muriel Primon de Barros. --  
2013.

121 f.

Orientadora: Tiana Tasca.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2013.

1. *Trichomonas vaginalis*. 2. Sistema purinérgico.  
3. Adenosina deaminase. 4. Localização celular. 5.  
Nutrientes essenciais. I. Tasca, Tiana, orient. II.  
Título.

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. A autora recebeu bolsa de estudos CAPES.



## AGRADECIMENTOS

Ao finalizar mais uma etapa em minha vida, que se fez valer pela superação, pelos conhecimentos adquiridos e pelas lições aprendidas, devo agradecer àqueles que, de uma forma ou de outra, colaboraram para que este estudo fosse realizado.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Farmácia e especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelas oportunidades oferecidas, pelo incentivo à pesquisa e pelo suporte científico.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite.

À Prof. Dr. Tiana Tasca, minha gratidão pela oportunidade, pela confiança depositada em mim, pela incessante dedicação e pelo exemplo profissional e pessoal, que levarei sempre comigo.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Parasitologia, Amanda, Camila Menezes, Patrícia, Odelta, Débora, Clara, Camila Dorneles, Dejoara, Mariana, Marina, Lúcia, Camila Félix, Nicolás e especialmente à Graziela, pela carinhosa acolhida, pela dedicação, pela prontidão em ajudar, por dividirem a comemoração ou a frustração dos experimentos que deram certo ou não, por me auxiliarem na solução dos problemas rotineiros, pelos momentos de descontração e principalmente, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Alexandre José Macedo e aos colegas do seu grupo de pesquisa, pela constante presença, pelo incentivo e pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Aos colegas e professores de outros grupos de pesquisa, pela colaboração na realização deste estudo, especialmente à Lisiane, Graziela, Laura, Mery, Mariele, Bruna e ao Juliano.

Ao Ricardo, pelo amor, carinho e amizade, pela companhia em dividir o dia a dia, pela compreensão e pelo incentivo.

Aos meus pais Gemanir e José Altino, pelo amor, por me guiarem sempre pelos caminhos mais corretos, pela educação que me proporcionaram e por não medirem esforços para a realização dos meus sonhos.

À minha irmã Rubia, pelo carinho e pela maneira simples de alegrar minha vida.

A todos os meus familiares e amigos, pelo constante apoio para que eu realizasse esta jornada.

Ao meu amigo Prof. Dr. Sérgio Faloni de Andrade, por me apresentar a pesquisa e seus desafios, por acreditar no meu potencial, por me encorajar a ir a diante, pela ajuda, parceria e exemplo.

À CAPES pela bolsa de mestrado que possibilitou minha dedicação exclusiva a este trabalho.



*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”*

Marcel Proust



## RESUMO

*Trichomonas vaginalis* é o protozoário flagelado que parasita o trato urogenital humano causando a tricomonose, doença sexualmente transmissível (DST) de origem não viral mais comum no mundo. Durante a infecção a aquisição de nutrientes, como nucleotídeos púricos, pirimidínicos e ferro é essencial à sobrevivência do parasito. *T. vaginalis* não sintetiza *de novo* purinas e pirimidinas, dependendo de vias de salvação para aquisição destas moléculas. O ferro desempenha um papel crucial na patogenicidade da tricomonose, influenciando a expressão de múltiplos genes envolvidos na virulência. Nucleotídeos extracelulares, especialmente o ATP, são liberados em situações de estresse, anoxia ou injúria, atuando como sinalizadores pró-inflamatórios ao sistema imune. As enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase degradam ATP à adenosina, esta com ação anti-inflamatória. A enzima adenosina deaminase (ADA) degrada adenosina à inosina. A presença desta cadeia enzimática em *T. vaginalis* sugere a modulação das concentrações nucleotídeos/nucleosídeos durante a inflamação. A atividade da ADA foi caracterizada em *T. vaginalis*, porém há poucos relatos sobre a participação desta enzima na sobrevivência do parasito, bem como, a localização celular e o efeito de nutrientes essenciais na atividade enzimática e na expressão gênica. O estudo da localização da ADA em *T. vaginalis* foi realizado, indicando a presença da enzima na membrana celular e no citoplasma do trofozoíto. Avaliando-se o perfil da ADA de diferentes isolados de *T. vaginalis* em uma condição de limitação de soro bovino, o qual representa a fonte de adenosina aos trofozoítos, não se observou diferenças significativas na deaminação da adenosina à inosina. Na avaliação do efeito de diferentes fontes de ferro ou a privação deste cátion na atividade e na expressão gênica da ADA foi possível verificar uma diminuição da atividade e um aumento na expressão gênica após a privação do ferro, reforçando a hipótese que este elemento pode modular a atividade das enzimas envolvidas na sinalização purinérgica. Os resultados obtidos nesta dissertação permitem a avaliação de importantes aspectos da ADA, contribuindo para o melhor entendimento do sistema purinérgico em *T. vaginalis* e seu papel no estabelecimento e manutenção da infecção e consequente sobrevivência do parasito.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*, sistema purinérgico, adenosina deaminase, localização celular, nutrientes essenciais.



## ABSTRACT

*Trichomonas vaginalis* is a flagellate protozoan that parasitizes the urogenital human tract causing trichomonosis, the non-viral sexually transmitted disease (STD) most common in the world. During infection the acquisition of nutrients such as purine and pyrimidine nucleotides, and iron is essential to the parasite survival. *T. vaginalis* lacks *de novo* purines and pyrimidines synthesis depending on the salvation pathway for the acquisition of these molecules. Iron plays a crucial role in trichomonosis pathogenesis, influencing the expression of multiple genes involved in virulence. Extracellular nucleotides, especially ATP, are released during stress, injury or anoxia, acting as a pro-inflammatory signaling to the immune system. The enzymes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase degrade ATP to adenosine with anti-inflammatory action. The adenosine deaminase (ADA) enzyme degrades adenosine to inosine. The presence of this enzymatic chain in *T. vaginalis* suggests the modulation of nucleotides/nucleosides concentrations during inflammation. The ADA activity was characterized in *T. vaginalis*, but there are few reports on the participation of this enzyme in the parasite survival, as well as the cellular localization and the effect of essential nutrients on enzyme activity and gene expression. The study of ADA localization in *T. vaginalis* was performed, indicating the presence of the enzyme on trophozoite cell membrane and cytoplasm. Evaluating the ADA profile in different *T. vaginalis* isolates in bovine serum limitation condition, which is the source of adenosine for the trophozoites, no significant differences were observed in the deamination of adenosine to inosine. Regarding the effect of different iron sources or iron deprivation in activity and gene expression of ADA, it was observed a decrease in activity and an increase in gene expression after iron deprivation, reinforcing the hypothesis that this element can modulate the activity of enzymes involved in the purinergic signaling. The results obtained in this study allow the assessment of important aspects of ADA, contributing to a better understanding of the purinergic system in *T. vaginalis* and its role in the establishment and maintenance of infection and consequent survival of the parasite.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, purinergic system, adenosine deaminase, cellular localization, essential nutrients.



## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| I. Introdução.....  | 1  |
| I.1 <i>Trichomonas vaginalis</i> .....  | 3  |
| I.2 Tricomonose .....   | 7  |
| I.2.1 Imunidade .....   | 10 |
| I.2.2 Mecanismos de Patogenicidade.....   | 11 |
| I.2.2.1 A influência do ferro nos mecanismos de patogenicidade .....  | 15 |
| I.3 Sistema Purinérgico .....   | 17 |
| I.3.1 ATP e Adenosina nas reações inflamatória e imunológica .....  | 18 |
| I.3.1.1 Inosina como sinalizador imunomodulatório .....   | 19 |
| I.3.2 Ectonucleotidases .....   | 20 |
| I.3.2.1 Ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (E-NTPDase, EC 3.6.1.5).....   | 21 |
| I.3.2.2 Ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) .....   | 21 |
| I.3.3 Ectonucleotidases em <i>T. vaginalis</i> .....  | 22 |
| I.3.4 Adenosina deaminase (ADA, EC 3.5.4.4).....  | 24 |
| I.3.4.1 Adenosina deaminase em <i>T. vaginalis</i> .....  | 25 |
| II. Objetivos.....  | 3  |
| III. Artigo científico.....   | 29 |
| III.1 CAPÍTULO 1 - Muriel Primon de Barros, Graziela de Vargas Rigo, Amanda Piccoli Frasson, Odelta dos Santos, Lisiane Smiderle, Silvana Almeida, Geraldo Atílio de Carli, Alexandre José Macedo, Tiana Tasca. Adenosine deaminase in <i>Trichomonas vaginalis</i> : cellular localization and effect of essential nutrients. .... | 33 |
| IV. Discussão Geral.....  | 40 |
| V. Conclusões Gerais .....  | 79 |
| VI. Perspectivas.....   | 79 |
| VII. Referências.....   | 79 |
| VIII. Anexos .....  | 97 |





## **I. Introdução**

---



## **I.1 *Trichomonas vaginalis***

O protozoário *Trichomonas vaginalis* pertence à família Trichomonadidae, à ordem Trichomonadida, à classe Parabasalia e ao filo Zoomastigina. Este protozoário habita o trato geniturinário humano, causando infecção - a tricomonose (SCHWEBKE e BURGESS, 2004). O primeiro relato de *T. vaginalis* na literatura médica foi em 1836, pelo médico europeu Alfred Doné, que descreveu a presença do protozoário em uma amostra de secreção vaginal humana. *T. vaginalis* foi considerado um habitante inofensivo da flora vaginal por quase 80 anos, até ser associado com vaginite. O ciclo de vida do protozoário é simples, com a divisão celular por fissão binária e a transmissão ocorre pelo ato sexual (FICHOROVA, 2009).

Morfologicamente, *T. vaginalis* é uma célula que pode variar de tamanho e forma. Como todos os tricomonádídeos, não possui estágio cístico, somente trofozoítico. Tipicamente em cultivo axênico, possui a forma piriforme, elipsoide ou oval e quando aderido às células epiteliais vaginais (CEVs) adquire a forma ameboide (PETRIN *et al.*, 1998). Condições físico-químicas como pH, temperatura, tensão de oxigênio e força iônica podem alterar a forma do protozoário. Além disso, *T. vaginalis* apresenta corpo celular muito plástico e pode formar pseudópodes, que são utilizados na captura de nutrientes e na fixação em superfícies sólidas (HONIGBERG e BRUGEROLLE, 1990). A formação de pseudocistos é relatada por alguns autores, sob condições ambientais desfavoráveis o parasito internaliza os flagelos (BENCHIMOL, 2004). Quanto ao tamanho, o protozoário apresenta em média, 10 µm de comprimento e 7,0 µm de largura (HONINGBERG e KING, 1964). O trofozoíto possui cinco flagelos, sendo quatro localizados na região anterior e o quinto incorporado à membrana ondulante. Os flagelos e a membrana ondulante são as estruturas responsáveis pela motilidade característica do protozoário. O núcleo está localizado próximo à extremidade anterior e assim como em outros eucariotos é circundado por um envelope nuclear poroso. O axóstilo é uma estrutura rígida e hialina que se projeta de uma extremidade à outra da célula. A pelta está localizada na região anterior do corpo celular e o complexo pelta-axóstilo pode promover a sustentação do trofozoíto e participar do processo de divisão celular. O citoesqueleto é composto de filamentos de actina e tubulina (BENCHIMOL, 2004). Interessantemente, os tricomonádídeos não possuem mitocôndria nem peroxissomo, mas apresentam uma importante e incomum organela, o

hidrogenossomo, grânulo denso com alta atividade enzimática que participa do metabolismo do piruvato formado durante a glicólise. Além disso, esta estrutura é o sítio de formação do hidrogênio molecular, cujo processo é acompanhado pela síntese de ATP (MÜLLER, 1993; BENCHIMOL, 2009).

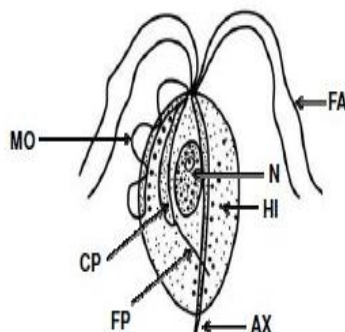


Figura 1: Características morfológicas de *T. vaginalis*. MO: membrana ondulante, CP: corpo parabasal, FP: filamento parabasal, AX: axóstilo, HI: hidrogenossomo, N: núcleo, FA: flagelos anteriores livres. Adaptado: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Trichomoniasis.htm>

Para sua sobrevivência, *T. vaginalis* requer uma série de nutrientes essenciais ao seu metabolismo, como carboidratos, aminoácidos, lipídeos, nucleotídeos púricos e pirimidínicos, ferro, vitaminas e sais inorgânicos. Os carboidratos constituem a principal fonte de energia, seu metabolismo fermentativo se dá em ambas as condições anaeróbica e aeróbica, ocorrendo no citoplasma e nos hidrogenossomos (MACK e MÜLLER, 1980; MÜLLER, 1988). Os principais produtos metabólicos incluem acetato, lactato, malato, glicerol, CO<sub>2</sub> e em condições anaeróbicas, H<sub>2</sub> (STEINBÜCHEL e MÜLLER, 1986; MÜLLER, 1993). Os carboidratos são a principal fonte de energia para *T. vaginalis*, no entanto, em condições limitadas de carboidratos, os aminoácidos sustentam a sobrevivência e o crescimento do parasito. Os trofozoítos possuem maior demanda de arginina, porém outros aminoácidos como treonina, leucina e metionina também são utilizados na produção de energia (PETRIN, 1998). Com relação ao metabolismo lipídico, *T. vaginalis* contém colesterol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e esfingomiéline, contudo, o parasito é incapaz de sintetizar ácidos graxos e esteróides, pela ausência de vias metabólicas para tal, desta forma, depende de fontes exógenas (BEACH *et al.*, 1990; 1991).

*T. vaginalis* não sintetiza purinas e pirimidinas *de novo*, dependendo de vias de salvação para aquisição dessas moléculas. O sistema de salvação de purinas é simples, constituído por uma única via, com duas enzimas, a purina nucleosídeo fosforilase (PNP, do inglês, *Purine Nucleoside Phosphorylase*) que catalisa a interconversão entre bases em nucleosídeos púricos e a purina nucleosídeo quinase (PNK, do inglês, *Purine Nucleoside Kinase*), que converte nucleosídeos em nucleotídeos. *T. vaginalis* não incorpora hipoxantina ou inosina nos nucleotídeos púricos e não possui atividade purina fosforibosiltransferase (PRTase, do inglês *Purine Phosphoribosyltransferase*) (HEYWORTH *et al.*, 1982; MILLER e LINDSTEAD, 1983). Segundo Munagala e Wang (2003) a adenosina é o primeiro precursor de todos os nucleotídeos purínicos em *T. vaginalis*, sendo que as ações sequenciais da PNP e PNK incorporam adenina e guanina exógenas, transformando-as em seus nucleotídeos correspondentes ou, se adenosina e guanina estiverem disponíveis no meio externo, após a internalização, somente por ação da PNK, são convertidas em seus devidos nucleotídeos (Figura 2). Com relação aos nucleotídeos pirimidínicos, *T. vaginalis* pode incorporar citidina, uridina, uracila e timidina (WANG e CHENG, 1984). Dois carreadores são responsáveis pelo transporte dos nucleosídeos para o interior do protozoário. O primeiro apresenta um sítio para nucleosídeos pirimidínicos e adenosina, e ainda um sítio específico para nucleosídeos púricos; enquanto o segundo transportador é capaz de acomodar adenosina e uridina, e em um sítio distinto, guanina (HARRIS *et al.*, 1988).

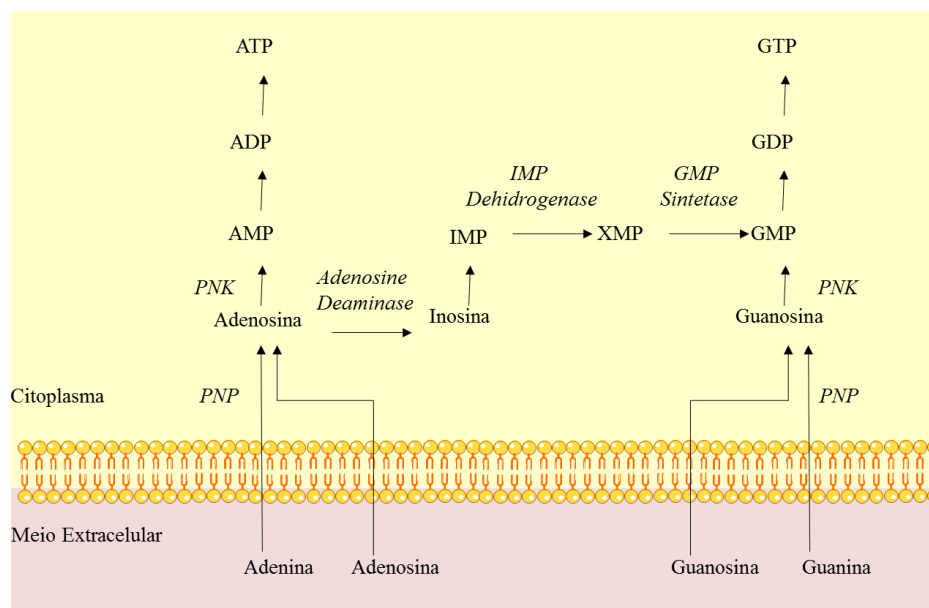


Figura 2: Esquema das vias de salvação de purinas em *T. vaginalis*. Elementos gráficos

utilizados na construção da figura obtidos através do site: [www.servier.fr](http://www.servier.fr).

Dentre os sais inorgânicos, destaca-se a importância do ferro para o crescimento e multiplicação de *T. vaginalis*. No meio de cultura, os trofozoítos necessitam em torno de 300 µM de ferro, esta alta demanda é necessária para manter níveis máximos da atividade das enzimas ferredoxina e piruvato-ferredoxina óxido redutase (PFOR), em função do metabolismo fermentativo do parasito, em que estas enzimas têm papel crucial na produção de energia. Por isso, a relação entre os níveis de ferro e a atividade enzimática hidrogenossomal é estreitamente ligada (GORRELL, 1985). Durante a colonização *in vivo*, a principal fonte de ferro é oriunda da lactoferrina, proveniente das células epiteliais vaginais e eritrócitos, que fornecem ferro suficiente para o crescimento e regulação dos fatores de virulência (MORENO-BRITO *et al.*, 2005; TORRES-ROMERO e ARROYO, 2009). Assim, *T. vaginalis* possui múltiplos sistemas de captação do ferro, como a presença de receptor para ligação holo-lactoferrina do hospedeiro, receptores para citocromo *c*, hemoglobina, hemina, heme e adesinas para eritrócitos e células epiteliais. Estes sistemas são expressos conforme as concentrações de ferro disponíveis, permitindo a rápida adaptação do parasito às constantes mudanças do sítio de infecção (ARDALAN *et al.*, 2009; TORRES-ROMERO e ARROYO, 2009).

Em função do *T. vaginalis* carecer de enzimas para sintetizar macromoléculas como purinas, pirimidinas e lipídeos, além de necessitar de vitaminas e sais minerais, como o ferro, este protozoário é um parasito obrigatório, dependente de vias de recursos e de um ambiente rico em nutrientes, considerado por estes motivos, um organismo fastidioso (PETRIN, 1998; CUDMORE *et al.*, 2004). *In vivo* estes nutrientes são provenientes da autólise bacteriana, células epiteliais vaginais e eritrócitos (oriundos da secreção endometrial). A aquisição destes nutrientes é realizada por fagocitose, pois é um sistema vantajoso para o parasito, já que a cavidade vaginal pode ser um ambiente hostil. Uma vez que o ambiente vaginal está em constante mudança, sob a influência do ciclo menstrual, deve-se considerar que tanto a sobrevivência, quanto o estabelecimento da infecção pelo patógeno, dependerá da capacidade de *T. vaginalis* adaptar-se a tais mudanças, incluindo variações no hospedeiro, níveis de ferro e resposta ao contato celular (PETRIN, 1998; PEREIRA-NEVES e BENCHIMOL, 2007). *In vitro*, o meio de cultura é normalmente suplementado com soro de cavalo, bovino ou humano, para proporcionar uma importante fonte nutricional para os trofozoítos (FRASSON *et al.*, 2012a). Considerando a importância de nutrientes para a sobrevivência e crescimento do

*T. vaginalis*, a investigação das vias de salvação, das enzimas envolvidas no metabolismo, dos efeitos provocados pela escassez e a contribuição destes nutrientes nos mecanismos de patogenicidade e evasão imune é relevante para o melhor entendimento dos processos de estabelecimento e manutenção da patobiologia.

## **I.2 Tricomonose**

*T. vaginalis* é o agente etiológico da tricomonose, a doença sexualmente transmissível (DST) de origem não viral mais comum no mundo. A estimativa global da tricomonose em 2008 foi uma incidência de aproximadamente 276 milhões de novos casos e uma prevalência de 187 milhões de adultos infectados, entre 15 e 49 anos (WHO, 2012). Porém, esses dados são subestimados, pois existem poucos estudos de prevalência com boa qualidade, as informações com relação à estimativa de duração da infecção são limitadas, os resultados de exames laboratoriais apresentam baixa sensibilidade e, além disso, há evidências de casos assintomáticos não diagnosticados em ambos os sexos (FICHOROVA, 2009; WHO, 2012). A prevalência mundial da tricomonose é muito maior quando comparada a outras DSTs curáveis, como gonorreia e sífilis, ambas com 36.4 milhões e clamídia, com 100.4 milhões de adultos infectados, entre 15 e 49 anos. Em contrapartida, a tricomonose não é notificável e não existe sistema de vigilância e detecção de isolados resistentes ao tratamento. Assim, o controle da infecção tem recebido relativamente pouca ênfase dos programas de saúde pública de controle de DSTs (SCHWEBKE e BURGESS, 2004; WHO, 2012).

Um amplo espectro de sinais e sintomas é provocado pela infecção por *T. vaginalis*. Em mulheres, cerca de um terço dos casos são assintomáticos. Nos casos sintomáticos, com quadro de infecção aguda, a inflamação é caracterizada por corrimento espumoso e purulento, devido à infiltração de neutrófilos, irritação e prurido vulvar, dor abdominal baixa e disúria (VAN DER POL, 2007; MILLER e NYIRJESY, 2011). Além disso, pode-se encontrar em aproximadamente 2,0 - 5,0 % dos casos, um sinal clínico específico desta patologia, que consiste em pequenos pontos hemorrágicos na mucosa vaginal ou cervical acompanhados de edema e eritema, que conferem uma aparência conhecida como *colpitis macularis* ou cérvix com aspecto de morango (PETRIN, 1998; MILLER e NYIRJESY, 2011). Estes sinais e sintomas são cíclicos e agravam-se após o período menstrual. Na infecção crônica, predominantemente os

sintomas são leves, com a presença de prurido e dispareunia, enquanto que a secreção vaginal pode ser escassa e misturada ao muco. A extensão da resposta inflamatória em defesa ao parasito pode determinar a gravidade dos sintomas (PETRIN, 1998; SCHWEBKE e BURGESS, 2004).

Em homens, a ausência dos sintomas na tricomonose ocorre na maioria dos casos e estes são considerados carreadores assintomáticos de *T. vaginalis* (PETRIN, 1998). A presença do parasito foi detectada em 66- 77 % dos parceiros de mulheres infectadas, e destes, cerca de 70 % eram assintomáticos (SEÑA *et al.*, 2007). A concentração de cátions de zinco nas secreções prostáticas é normalmente em torno de 4,5 - 7,0 mM, podendo ser tóxica ao parasito, limitando ou eliminando a tricomonose nos homens. No entanto, em prostatites crônicas, onde a concentração do zinco é menor, cerca de 1,6 mM, este não possui ação tóxica e o parasito pode ser encontrado na glândula prostática causando inflamação aguda não-específica (KRIEGER *et al.*, 1982). Quando sintomática, a doença está associada à uretrite, epididimite, prostatite, função espermática reduzida e infertilidade (FICHOROVA, 2009).

A investigação laboratorial é essencial no diagnóstico da tricomonose, permitindo diferenciar a tricomonose de outras DSTs (DE CARLI, 2007). Os métodos mais frequentemente empregados no diagnóstico desta patologia apresentam relativamente baixa sensibilidade, como o exame direto a fresco e preparações coradas (LEHKER e ALDERETE, 2000). O método cultural é o padrão-ouro para o diagnóstico, no entanto, são necessários alguns dias para a identificação do parasito, tempo durante o qual os pacientes infectados podem continuar a transmitir a infecção (DE CARLI, 2007). O advento da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) tornou-se uma nova alternativa para o diagnóstico (BRAVO *et al.*, 2010). Outros testes de diagnóstico modernos incluem o *OSOM Trichomonas Rapid Test* e sondas de ácidos nucleicos (BRAVO *et al.*, 2010).

Apesar de em alguns casos a tricomonose ser tratada com facilidade, em outros, sérias complicações à saúde podem ocorrer. Dentre as implicações causadas pelo parasito estão: predisposição de mulheres à doença inflamatória pélvica atípica (CHERPES *et al.*, 2006), câncer cervical (VIAKKI *et al.*, 2000) e infertilidade (GOLDSTEIN *et al.*, 1993); complicações na gravidez (KLEBANOFF *et al.*, 2001), nascimento prematuro e baixo peso de recém-nascidos (COTCH *et al.*, 1991; 1997); e aumento da suscetibilidade ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SORVILHO *et al.*, 2001). Considera-se a facilitação da aquisição do vírus HIV, por até duas vezes



maior, a mais preocupante complicação gerada pelo *T. vaginalis* (MC CLELLAND *et al.*, 2007). Isto ocorre pelo parasito induzir a resposta imune, que leva ao recrutamento de linfócitos CD4+ e macrófagos à mucosa vaginal e cervical (LEVINE *et al.*, 1998) e, provocar pontos hemorrágicos na cérvice e endocérvice, comprometendo a barreira mecânica ao vírus (GILBERT *et al.*, 2000). Além disso, uma elevada carga viral é encontrada nos compartimentos seminal e cérvico-vaginal de pacientes com tricomonose (MOODLY *et al.*, 2002). Estes fatos corroboram entre si facilitando a aquisição e transmissão do HIV, já que, no sítio de infecção há acúmulo dos linfócitos CD4+ (células-alvo do HIV), uma alta carga viral para infectá-los e pontos hemorrágicos que facilitam o acesso do vírus à corrente sanguínea. Mais recentemente, foi demonstrado que a tricomonose também está associada a tipos de câncer de próstata agressivos (SUTCLIFFE, 2010) e aumenta a susceptibilidade ao papilomavírus humano (HPV) (FICHOROVA *et al.*, 2012).

No tratamento da tricomonose, os únicos fármacos recomendados pelo *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) são o metronidazol e tinidazol, utilizados geralmente via oral, 2,0 gramas em dose única, sendo o metronidazol o fármaco de escolha (HELMS *et al.*, 2008). Ambos pertencem à classe dos 5-nitroimidazóis, cujo mecanismo de ação corresponde à entrada do fármaco na célula por difusão, com posterior redução do grupamento nitro pela enzima piruvato-ferredoxina óxido redutase, encontrada nos hidrogenossomos, com conseqüente produção de intermediários radicais-nitro citotóxicos, que induzem a quebra da fita de DNA, provocando a morte dos trofozoítos (KULDA, 1999). No entanto, estes medicamentos possuem uma série de efeitos colaterais que incluem náuseas, vômitos, cefaleia, insônia, vertigem e sonolência (MILLER e NYIRJESY, 2011). O uso na gestação não é recomendado pelo *Centers for Disease Control* (CDC) por apresentar riscos à saúde do feto (KLEBANOFF *et al.*, 2001). Ainda, outro agravante da tricomonose são os casos emergentes de resistência dos isolados frente a esses fármacos, considerado uma falha terapêutica no tratamento (DUNNE *et al.*, 2003). É estimado que aproximadamente 2,5 - 5,0 % de todos dos casos de tricomonose apresentem algum nível de resistência no tratamento com metronidazol (SCHWEBKE e BURGESS, 2004). Considerando a alta prevalência mundial da tricomonose, aproximadamente 187 milhões de casos, esta resistência torna-se um fator preocupante a nível saúde pública. Neste contexto, estudar os processos bioquímicos envolvidos na sobrevivência, patogenicidade e resistência do parasito, assim como,

buscar novos alvos e moléculas com potencial terapêutico são de extrema relevância perante o cenário mundial desta doença.

### I.2.1 Imunidade

A infecção por *T. vaginalis* tem demonstrado ativar receptores do tipo *toll-like* (TLR)-4 induzindo as células epiteliais vaginais liberarem inúmeras substâncias na secreção vaginal (FICHOROVA, 2009). A resposta do hospedeiro em defesa à infecção por *T. vaginalis* envolve múltiplos mecanismos que operam em diferentes níveis, sendo constituída de três componentes principais: i) os fatores não imunológicos; ii) os mecanismos não específicos de resposta imune inata, e; iii) a resposta específica adaptativa (SCHWEBKE e BURGESS, 2004; FICHOROVA, 2009; FIGUEROA-ANGULO *et al.*, 2012).

Os fatores não imunológicos compreendem os efeitos de elementos ambientais, tais como, ferro, zinco e poliaminas, que interferem diretamente na expressão de genes de virulência de *T. vaginalis*. No ambiente vaginal, a escassez de ferro pode comprometer a citoaderência e a resistência ao complemento, já altas concentrações de zinco e baixas concentrações de poliaminas têm efeito negativo perante citotoxicidade exercida pelo parasito (FIGUEROA-ANGULO *et al.*, 2012).

Dentre os fatores imunológicos, a resposta imune inata em mucosas é considerada a primeira linha de defesa a microrganismos, pela indução de citocinas pró-inflamatórias, fatores antimicrobianos e pela estimulação da resposta imune adaptativa (CAUCI e CULHANE, 2007). Após a adesão, através da ligação de lipofosfoliglicano (LPG) presente na superfície do parasito, como uma proteína tipo galectina das células epiteliais vaginais do hospedeiro, desencadeia-se o aumento da produção de quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória, principalmente interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), fator ativador de plaquetas, leucotrieno B4 (LTB4) e proteína inflamatória 3 $\alpha$  de macrófagos (RYU, *et al.*, 2004; KUCKNOOR *et al.*, 2007; FICHOROVA, 2009; HAN *et al.*, 2009). Estas quimiocinas estimulam a infiltração de neutrófilos, principais responsáveis pela mudança citológica no sítio de infecção, por isso, a presença destas células na secreção vaginal de pacientes com tricomonose é predominante (RYU *et al.*, 2004). Alguns estudos têm demonstrado que a produção de IL-8 e de óxido nítrico (NO) por neutrófilos e monócitos é estimulada em

resposta a *T. vaginalis*. A IL-8 é um potente quimioatraente não só para neutrófilos, mas também para linfócitos T, basófilos e eosinófilos (RYU *et al.*, 2004; SHAIIO *et al.*, 1995; HAN *et al.*, 2009). O NO, uma molécula gasosa que atravessa as membranas, atuando como sinalizador e agente tóxico sobre as células é outro componente importante durante a resposta imune inata, por promover a citotoxicidade contra o parasito, além de provocar a liberação de citocinas, ativar moléculas de adesão e estar envolvido com a sinalização purinérgica (COLEMAM, 2001; HAN *et al.*, 2009; FRASSON *et al.*, 2012b). Estas moléculas são encontradas nas secreções vaginais de pacientes sintomáticos e proporcionam a indução de um rápido acúmulo de neutrófilos no local afetado, a fim de eliminar o agente patogênico durante a invasão da mucosa (FRASSON *et al.*, 2012b).

Com relação à resposta imune adaptativa, a infecção por *T. vaginalis* em humanos resulta em anticorpos parasito-específicos, embora em alguns casos da doença relatou-se a ausência de anticorpos vaginais detectáveis (ABRAHAM *et al.*, 1996; SCHWEBKE e BURGESS, 2004). Em secreções vaginais de mulheres com tricomonose aguda, somente as classes de imunoglobulinas (Ig) A e G foram detectadas (YADAV *et al.*, 2005). Em homens, anticorpos IgG e IgM detectados podem estar envolvidos no estabelecimento da tricomonose sintomática, comparados aos casos assintomáticos (IMAM *et al.*, 2007). Todavia, todos os anticorpos produzidos e/ou secretados durante a tricomonose promovem somente uma proteção limitada ao parasito, decaindo progressivamente após a erradicação da infecção pelo tratamento (CUDMORE *et al.*, 2004).

Neste contexto, o hospedeiro conta com vários recursos não imunológicos e imunológicos para a defesa do sítio de infecção, principalmente com relação à produção de quimiotraentes e recrutamento de inúmeros tipos de células imunes, a fim de evitar a colonização e parasitismo por *T. vaginalis*. Porém, mesmo com tantas vias de ataque ao parasito, este consegue estabelecer a doença, devido à presença de mecanismos de patogenicidade que driblam as defesas do hospedeiro.

## **I.2.2 Mecanismos de Patogenicidade**

Os mecanismos envolvidos na infecção e na patogênese da tricomonose baseiam-se na interação parasito-hospedeiro, um processo complexo, no qual estão

envolvidos componentes associados à superfície celular do parasito e às células epiteliais do hospedeiro e também, componentes solúveis encontrados nas secreções vaginal e uretral (LENKER e ALDERETE, 2000).

*T. vaginalis* é um parasito exclusivo do trato urogenital humano. Logo após a infecção, o sucesso na colonização depende da capacidade do parasito em se ligar, degradar e penetrar na camada de muco que protege as CEVs, para posterior citoaderência. O muco é constituído principalmente de mucina, uma glicoproteína, resistente a ação proteolítica, com característica de gel, que confere uma formidável barreira física a patógenos (GERKEN, 1993). A ligação dos trofozoítos no muco é a primeira etapa para o parasito manter-se no sítio de infecção, seguida pela secreção de mucinases, enzimas que solubilizam a mucina, permitindo o avanço na matriz mucosa, através da movimentação flagelar dos trofozoítos, até enfim, alcançar as CEVs (LEHKER e SWEENEY, 1999).

A citoaderência é pré-requisito para o estabelecimento e manutenção da infecção crônica de *T. vaginalis* (LENKER e ALDERETE, 2000). Cinco proteínas de superfície, denominadas adesinas, AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23, foram encontradas envolvidas no processo de adesão (Figura 3) (GARCIA *et al.*, 2003; MORENO-BRITO *et al.*, 2005; KUCKNOOR *et al.*, 2007). Quatro destas adesinas apresentam homologia com enzimas metabólicas, porém curiosamente, a AP23 ainda não foi identificada. Estas podem atuar tanto como enzimas metabólicas nos hidrogenossomos e citoplasma, quanto como adesinas na superfície do parasito, como receptores de hemoglobina e heme, e ainda, podem participar de mecanismos de mimetismo molecular envolvidos na evasão imune, exceto a AP120, neste último caso (ALDERETE *et al.*, 2001; MORENO-BRITO *et al.*, 2005). Além das adesinas, o lipofosfoglicano (LPG) de superfície, os receptores da matriz extracelular e as cisteína proteínases (CPs), tais como, TvCP30 e TvCP62, localizadas na superfície do parasito, também participam da citoaderência (MENDONZA-LÓPEZ *et al.*, 2000; HERNANDEZ *et al.*, 2004; FICHOROVA, 2006). O LPG é um abundante componente do glicocálice na superfície de *T. vaginalis*, que medeia a aderência do parasito nas CEVs pela ligação na galectina-1 da célula hospedeira, também estimulando a modificação do parasito para a forma ameboide (Figura 3) (FICHOROVA *et al.*, 2006).

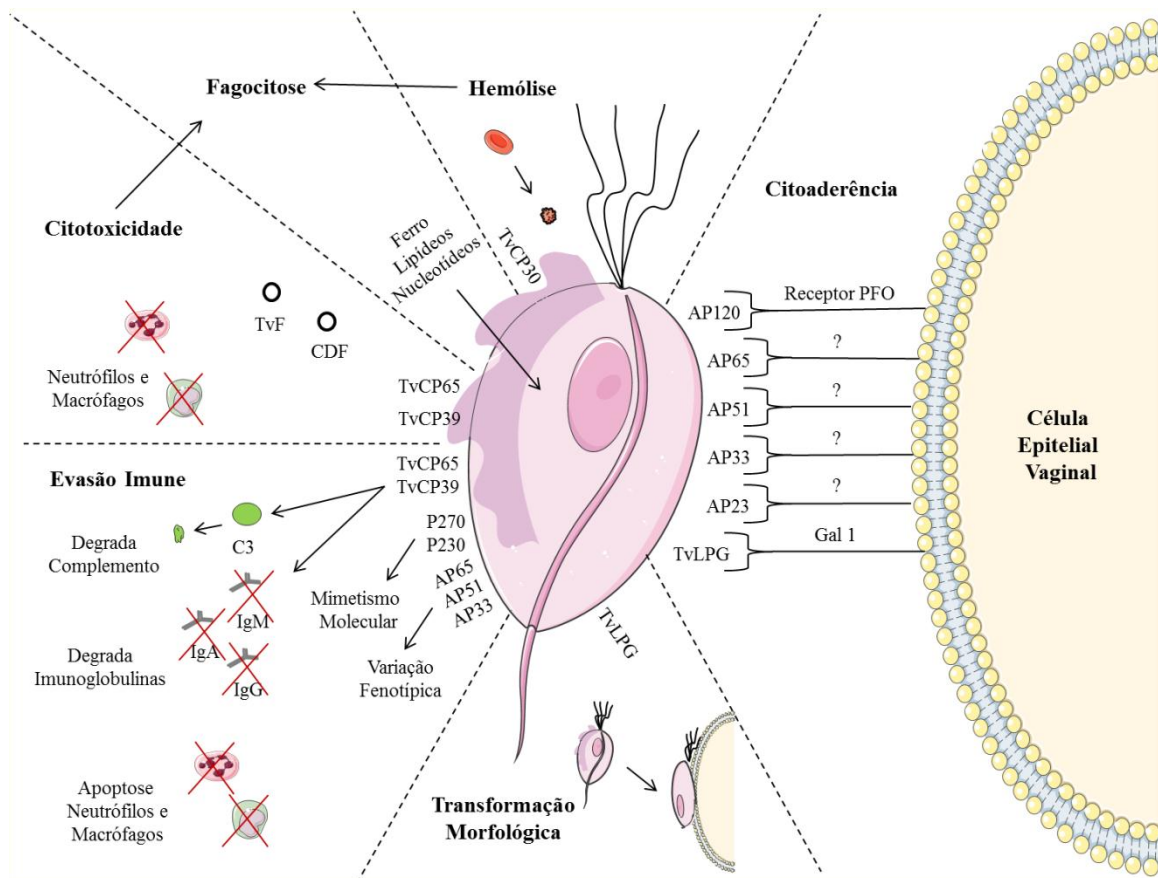
Após a colonização estar bem estabelecida, *T. vaginalis* pode sobreviver durante muito tempo na hostilidade do ambiente vaginal. No entanto, para que isso ocorra, o parasito depende de mecanismos para aquisição de nutrientes e para evasão do sistema

imune. A aquisição de nutrientes basicamente ocorre por fagocitose, através da formação de pseudópodes ou por extensão da membrana. Os trofozoítos são capazes de ingerir e degradar com eficiência bacilos de Döderlein, CEVs e células epiteliais cervicais, leucócitos, eritrócitos, leveduras, espermatozoides e células prostáticas, adquirindo desta forma ferro, lipídeos, nucleosídeos, dentre outros nutrientes importantes para o metabolismo (Figura 3) (PEREIRA-NEVES *et al.*, 2007; FIGUEROA-ANGULO *et al.*, 2012). Ainda não foram identificadas moléculas específicas envolvidas na fagocitose, porém análises *in silico* do genoma de *T. vaginalis*, mostraram uma considerável diversidade de proteínas que possivelmente estariam envolvidas no tráfego através da membrana (CARLTON *et al.*, 2007; FIGUEROA-ANGULO *et al.*, 2012). Como a mucosa vaginal pode ser um meio nutricional pobre para *T. vaginalis*, os eritrócitos, provenientes da secreção menstrual, são uma importante fonte de lipídeos e ferro (LENKER e ALDERETE, 2000). A hemólise, promovida pelo parasito, parece ocorrer em três fases, onde a interação é contato-dependente, permitindo inicialmente que os trofozoítos se liguem aos eritrócitos, seguida pela liberação de CPs, incluindo a TvCP30, que formam poros na membrana do eritrócito e auxiliam na degradação de hemoglobina, para finalmente, ocorrer a lise com posterior fagocitose (Figura 3) (ARROYO e ALDERETE, 1989; FIORI *et al.*, 1993).

A citotoxicidade realizada pelo parasito participa tanto de eventos da aquisição de nutrientes, quanto dos mecanismos de evasão imune, dependendo ou não, do contato com as células do hospedeiro. Nos processos contato-dependentes a citotoxicidade envolve uma cascata de eventos, que resultam na lise, fagocitose e desintegração da monocamada celular ou das células de defesa, como os neutrófilos e macrófagos do hospedeiro (ALDERETE e PEARLMAN, 1984; KANG *et al.*, 2006). Nos processos contato-independentes, moléculas secretadas pelo parasito, tais como TvF (do inglês *cell-free T. vaginalis culture fator*) e a CDF (do inglês *cell-detachinig fator*) colaboram com os danos celulares. Outras CPs, como TvCP65 e TvCP39, degradam proteínas do meio vaginal, como colágeno IV e fibronectina, formadoras da matriz extracelular (Figura 3) (FIGUEROA-ANGULO *et al.*, 2012).

Para manter a infecção vaginal crônica e suportar as constantes mudanças ambientais ocorridas no ciclo menstrual, o parasito dispõe de muitas estratégias para a evasão do sistema imune, como: a) controle e destruição das células imunes do hospedeiro, por indução à apoptose de neutrófilos e macrófagos (KANG, 2006); b)

degradação das proteínas do complemento, via CPs, reguladas por altas concentrações de ferro, durante o período menstrual (ALDERETE *et al.*, 2001); c) degradação das imunoglobulinas humanas, IgG, IgM e IgA, via CPs, principalmente TvCP65 e TvCP39 (HERNANDEZ-GUTIERREZ *et al.*, 2004); d) variação fenotípica, baseada em mudanças no epítipo de ligação do anticorpo, com dois principais imunógenos, P270 e P230 (LENKER e ALDERETE, 2000; ALDERETE, 1999); e) mimetismo molecular, com revestimento da superfície do trofozoítos com proteínas homólogas do hospedeiro, envolvendo principalmente as adesinas AP65, AP51 e AP33 (ALDERETE *et al.*, 2001), e; f) secreção contínua de grandes quantidades de proteínas solúveis altamente



imunogênicas, para neutralizar a defesa específica anti-*T. vaginalis* de anticorpos e linfócitos T citotóxicos, dentre outros processos evasão (Figura 3) (LENKER e ALDERETE, 2000).

Figura 3: Esquema representativo dos principais mecanismos de patogenicidade de *T. vaginalis*. Elementos gráficos utilizados na construção da figura obtidos através do site: [www.servier.fr](http://www.servier.fr).

Com a elucidação do genoma de *T. vaginalis* em 2007 por Carlton e colaboradores, foi possível compreender melhor os mecanismos de regulação dos fatores de virulência a nível de expressão gênica. A precisa regulação da expressão de genes é essencial para a adaptação do parasito a mudanças ambientais. A resposta é altamente regulada por múltiplas proteínas que determinam quais genes devem ser expressos ou silenciados. *T. vaginalis* possui vários mecanismos para controlar a expressão de fatores de virulência, especialmente das CPs e adesinas. Esta regulação pode ser observada a nível transcricional, pós-transcricional, traducional e pós-traducional (FIGUEROA-ANGULO *et al.*, 2012). Interessantemente, o ferro exerce uma forte influência na expressão de vários genes de *T. vaginalis* e as concentrações ambientais deste elemento, regulam certos fatores de virulência e por consequência, até mesmo a sobrevivência dos trofozoítos, indicando que este é um nutriente essencial ao parasito.

#### **I.2.2.1 A influência do ferro nos mecanismos de patogenicidade**

Como anteriormente citado, o ferro é um elemento essencial ao crescimento e manutenção da infecção por *T. vaginalis*. O parasito demanda aproximadamente 300  $\mu\text{M}$  deste cátion no meio de cultivo, enquanto uma bactéria, por exemplo, requer aproximadamente 0,2  $\mu\text{M}$  (GORRELL, 1985). Portanto, o ferro é regulador de uma série de processos na interação parasito-hospedeiro.

A expressão de vários genes de virulência, incluindo adesinas e CPs, sofrem modulação dependendo das concentrações do ferro presente no ambiente (RYU, *et al.*, 2001). Durante a citoaderência, altos níveis de ferro estimulam a transcrição e síntese das adesinas de superfície AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23. Além disso, o ferro estimula a colocalização dessas adesinas na superfície celular, diferente da habitual localização hidrogenossomal. Portanto, quando o parasito se encontra em um meio com baixa concentração de ferro, torna-se incapaz de sintetizar novas adesinas que favorecem a ligação às CEVs (GARCIA *et al.*, 2003; MORENO-BRITO *et al.*, 2005). Alternativamente, o parasito pode ligar-se a proteínas da matriz extracelular e membrana basal, como fibronectina e laminina, estabelecendo a infecção. Em um microambiente restrito em ferro, observa-se um aumento da ligação do parasito à fibronectina, o que é importante para a manutenção da patologia (CROUCH *et al.*,

2001). A expressão, atividade proteolítica e localização na membrana de certas CPs, também são diferencialmente moduladas por ferro e estas possuem importante função na citoaderência, citotoxicidade, hemólise e degradação de imunoglobulinas humanas e de proteases secretadas por leucócitos (FIGUEROA-ANGULO, 2012). Em condições restritas de ferro houve um aumento da atividade citotóxica TvCP65, assim como um aumento da indução à apoptose da célula hospedeira pela TvCP30 (TORRES-ROMERO e ARROYO, 2009)

O estudo de Alderete e colaboradores (1995), concluiu que *T. vaginalis* apresenta resistência à lise do sistema complemento do hospedeiro na presença de um meio rico em ferro. O ambiente vaginal é um ambiente hostil, sofrendo profundas alterações durante o ciclo menstrual. Na menstruação, o parasito entra em contato com proteínas, eritrócitos e o complemento, este último, citotóxico ao *T. vaginalis*, levando à lise dos trofozoítos através de uma via alternativa sem a presença de anticorpos. Apesar do sangue menstrual conter uma elevada quantidade de complemento, o que leva à redução do número dos trofozoítos, também possui grande concentração de ferro, importante fator de resistência a este sistema, que aumenta a expressão de proteases que clivam a porção C3 do complemento e assim, favorecem o parasitismo.

A expressão da proteína HSP70 (do inglês *Heat Shock Protein 70*), que protege o trofozoíto de efeitos tóxicos e outros estresses, também sofre influência do ferro. Em meio com depleção deste cátion, há aumento da expressão de HSP70 e também expressão de novas isoformas, o que sugere que a carência do elemento pode ser considerada um sinal de estresse, que afeta seletivamente a expressão citosólica e hidrogenossomal de HSP70 entre outras proteínas envolvidas na virulência do parasito (LINDQUIST e CRAING, 1988; TORRES-ROMERO e ARROYO, 2009). O ferro também pode modular a localização celular e fosforilação do imunógeno P270, o qual desencadeia a variação fenotípica, um mecanismo que colabora com evasão imune. Trofozoítos cultivados em meio com baixa concentração de ferro apresentaram P270 localizada na membrana, enquanto que, trofozoítos cultivados com alta concentração do elemento apresentaram maior quantidade de P270 fosforilada e localizada no citoplasma (ALDERETE, 1999).

Ademais, a expressão das enzimas hidrogenossomais, ferredoxina, succinil CoA sintetase, enzima málica e piruvato:ferredoxina oxiredutase, envolvidas no metabolismo (GORRELL, 1985; KIM *et al.*, 2006) e as enzimas nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NTPDase 1), ecto-5'-nucleotidase, ectoATPase e ecto-fosfatase,



que hidrolisam nucleotídeos extracelulares como ATP, ADP e AMP, também apresentaram modulação pelo ferro (TASCA *et al.*, 2005; DE JESUS *et al.*, 2006; TORRES-ROMERO e ARROYO, 2009).

### **I.3 Sistema Purinérgico**

Nucleotídeos e nucleosídeos são vastamente encontrados em organismos vivos, produzindo tanto efeitos intracelulares, quanto extracelulares. O ATP intracelular é principalmente utilizado para produção de energia, essencial em processos de transporte ativo, motilidade celular e biossíntese. Enquanto isso, o ATP extracelular é considerado uma poderosa molécula sinalizadora, que modula múltiplas funções teciduais, incluindo neurotransmissão, contração muscular, vasodilatação, inflamação, resposta imune, agregação plaquetária, proliferação e crescimento celular, assim como funções cardíaca, gastrointestinal e hepática, dentre outras (ROBSON *et al.*, 2006; BURNSTOCK, 2006a).

Inicialmente, um artigo de Drury e Szent-Györgi em 1929 descreveu a ação do ATP e da adenosina sobre o coração e vasos sanguíneos. Em 1972 a hipótese da neurotransmissão purinérgica foi proposta por Burnstock (BURNSTOCK, 1972) e desde então, a sinalização purinérgica vem sendo estudada como uma cascata com múltiplas etapas: i) a secreção celular dos nucleotídeos ou nucleosídeos; ii) a sinalização do ATP e da adenosina, via ativação de purinoceptores; e iii) a hidrólise dos nucleotídeos, pelas ectonucleotidases.

O ATP e outros nucleotídeos podem ser armazenados em vesículas e secretados constitutivamente por difusão ou exocitose, ou então, podem ser secretados por células com dano na membrana celular. A última situação ocorre perante lise celular, choque traumático ou certas condições inflamatórias (FREDHOLM, 2011; BURNSTOCK, 2007). Então, inicia-se a ligação a receptores específicos, conhecidos como purinoceptores e/ou a hidrólise pelas enzimas ectonucleotidases.

Os purinoceptores são classificados em P1 e P2. Os receptores P1 metabotrópicos, medeiam a interação com a adenosina extracelular, com diferentes afinidades. Apresentam quatro subtipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, todos acoplados a proteína G, apresentando influência sobre a enzima adenilato ciclase. Os subtipos A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> inibem a adenilato ciclase, enquanto A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> ativam esta enzima, com produção de AMP cíclico (cAMP) (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998). Os receptores P2 reconhecem ATP, ADP, UTP e UDP, são divididos em duas subfamílias, com base em dados

farmacológicos, funcionais e de clonagem molecular. Os receptores P2X ionotrópicos, ligados a canais iônicos, compartilham dois domínios transmembrana, com N- e C-terminais intracelulares e um longo laço extracelular entre as regiões transmembranas. Apresentam sete subtipos: P2X<sub>1-7</sub>, com sítio de ligação para ATP, antagonistas competitivos e íons metálicos modulatórios, sendo permeáveis aos cátions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, e Ca<sup>2+</sup>. Os receptores P2Y metabotrópicos, acoplados à proteína G, compartilham sete domínios transmembrana. Subdividem-se em: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> e P2Y<sub>14</sub>, que respondem ao ATP, porém, apresentam maior afinidade por ADP, UTP e UDP (Figura 4) (BURNSTOCK, 2006b; ABBRACCHIO *et al.*, 2009; FALK *et al.*, 2012).

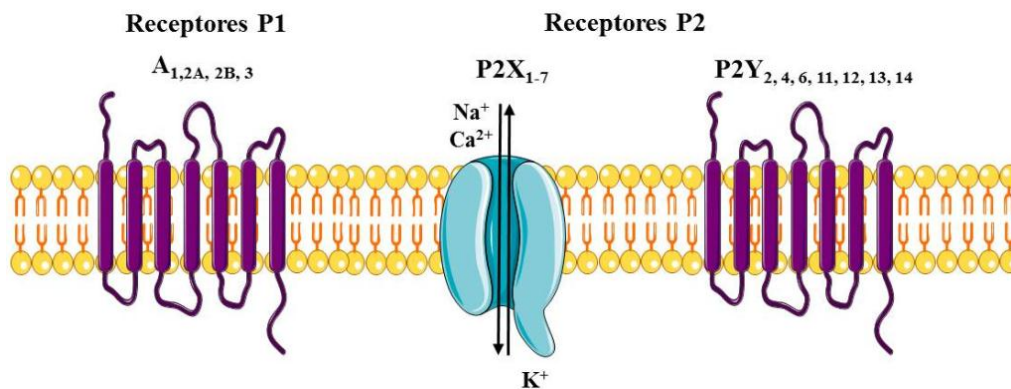


Figura 4: Representação esquemática dos purinoceptores. Receptores P1, acoplados a proteína G. Receptores P2, divididos em duas subfamílias, P2X, ligados a canais iônicos e P2Y acoplados a proteínas G. Elementos gráficos utilizados na construção da figura obtidos através do site: [www.servier.fr](http://www.servier.fr).

### I.3.1 ATP e Adenosina nas reações inflamatória e imunológica

Os efeitos do ATP e da adenosina extracelulares, mediados pela interação com os receptores purinérgicos, desempenham um importante papel nas reações inflamatória e imunológica, através de complexos mecanismos desempenhados sobre diversos tipos celulares. Em condições normais, o meio intracelular possui 3-10 mM de ATP, enquanto o meio extracelular apresenta somente 400-700 nM. Porém, em resposta a patógenos externos ou à injúria tecidual, como situações de estresse, anóxia ou lesão, o ATP é liberado para o meio extracelular atuando como uma molécula associada ao perigo, DAMP (do inglês *Danger-Associated Molecular Patterns*), iniciando uma

resposta imune primária (BOURS *et al.*, 2006). Sendo assim, o ATP extracelular pode agir como uma molécula pró-inflamatória, que através da ligação aos receptores P2, promove o recrutamento de macrófagos, células dendríticas, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, linfócitos B e aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, IL-18 e TNF- $\alpha$ . Em neutrófilos, a primeira linha de defesa em infecções, o ATP promove a adesão às células endoteliais, recrutamento, degranulação, retardo da apoptose e produção de espécies reativas de oxigênio (BOURS *et al.*, 2006; BHARDWAJ e SKELLY, 2009).

A função sinalizadora do ATP extracelular está intimamente ligada à adenosina, o produto final de sua hidrólise, e este nucleosídeo também pode ser considerado uma molécula associada ao perigo, pois a elevação acentuada de seus níveis extracelulares indica dano tecidual. No entanto, ao contrário do ATP, a adenosina tem efeito anti-inflamatório, pela ligação aos receptores P1, predominante pela ligação e ativação do receptor A<sub>2A</sub> (HASKÓ e CRONSTEIN, 2004; BOURS *et al.*, 2006). Em neutrófilos, a adenosina extracelular pode inibir a degranulação, a geração de espécies reativas de oxigênio, a adesão ao endotélio vascular e a produção de citocinas e do leucotrieno B4. Além disso, a adenosina inibe a produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  por macrófagos e também atenua a migração e resposta de linfócitos T e células dendríticas (HASKÓ e CRONSTEIN, 2004; JUNGER, 2008). A exagerada estimulação da inflamação e do sistema imune pode conduzir a uma inflamação descontrolada, resultando em danos celulares e destruição de tecidos saudáveis. Assim, as respostas inflamatórias e imunes devem ser firmemente reguladas. O ATP e a adenosina, juntamente com os receptores purinérgicos e a atividade das ectonucleotidases, colaboram com estas respostas, compreendendo um sistema de *feedback* purinérgico, que deve ser muito bem controlado (BOURS *et al.*, 2006).

### **I.3.1.1 Inosina como sinalizador imunomodulatório**

A inosina, o produto da deaminação da adenosina, apresenta alta concentração extracelular em caso de injúria, quando o nível de adenosina também estiver elevado. A importância da adenosina extracelular, como uma molécula sinalizadora durante a inflamação e resposta imune, já está bem aceita. Diferentemente, atribuem-se poucos papéis de sinalização à inosina, pois geralmente acredita-se que a inosina é um produto

inativo da degradação da adenosina, para que esta perca sua ação sinalizadora. Porém, este conceito está mudando, já que foi reconhecido que a inosina pode ligar-se aos receptores da adenosina e iniciar eventos sinalizadores intracelulares, assim como, interferir na função celular independente de receptores (GOMEZ e SITKOVSKY, 2003; HASKÓ *et al.*, 2004). Os efeitos imunomodulatórios da inosina são atribuídos à supressão da síntese de IL-1, IL-12, proteína inflamatória de macrófagos  $1\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em macrófagos, atenuação da produção de IL-8 pelas células epiteliais, além da inibição da ativação de neutrófilos e linfócitos e indução de produção da IL-10, uma citocina com efeito anti-inflamatório (MARTON *et al.*, 2001; HASKÓ *et al.*, 2004).

### **I.3.2 Ectonucleotidases**

Após a liberação dos nucleotídeos para o meio extracelular, esses são degradados por enzimas localizadas na superfície das células ou solúveis no meio intersticial, produzindo seus respectivos nucleotídeos/nucleosídeos e fosfato livre. Essas enzimas fazem parte de diferentes famílias de ectonucleotidases e compartilham características comuns, como sítio catalítico voltado para o meio extracelular ou para o lúmen de organelas, ligação à membrana plasmática ou a organelas como lisossomos ou complexo de Golgi, existência de isoformas extracelulares clivadas e solúveis, além da atividade catalítica máxima depender de pH levemente alcalino e de cátions divalentes como cálcio ou magnésio e os valores de  $K_M$  encontrarem-se geralmente na faixa de micromolar (ZIMMERMANN, 2000).

Os membros das diferentes famílias de ectonucleotidases se sobrepõem tanto na distribuição nos tecidos, quanto na especificidade ao substrato. Dessa maneira, os nucleosídeos 5'-tri- e difosfatados podem ser hidrolisados por ação das enzimas pertencentes às famílias ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase, EC 3.6.1.5), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP, EC 3.1.4.1) e das fosfatases alcalinas. Os nucleosídeos 5'-monofosfatos podem sofrer a hidrólise pela atividade da ecto-5'-nucleotidase (EC, 3.1.3.5), das fosfatases alcalinas e por alguns membros da família E-NPP. Estas enzimas já foram relacionadas com várias funções, porém, o principal papel funcional consiste no término da sinalização por nucleotídeos, seguido pela recaptação de purinas (ZIMMERMANN, 2000; 2001).

### **I.3.2.1 Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase, EC 3.6.1.5)**

A família E-NTPDase (superfamília GDA1-CD39) é composta por oito membros, já caracterizados e clonados em mamíferos, todos com cinco domínios altamente conservados, as ACRs (do inglês, *Apyrase Conserved Regions*), presumidamente com maior relevância para a atividade catalítica. Além de mamíferos, essas enzimas também já foram identificadas em invertebrados, plantas, fungos e protozoários (HANDA e GUIDOTTI, 1996; ZIMMERMANN, 2001; SANSOM *et al.*, 2008; KNOWLES, 2011).

As E-NTPDases catalisam a hidrólise de nucleotídeos tri- e difosfatados levando à formação dos respectivos nucleotídeos e fosfato livre. Estas enzimas possuem diferenças quanto à localização e a preferência por substrato. As NTPDases 1, 2, 3 e 8, estão localizadas na superfície celular. A NTPDase 1 (CD39, ecto-apirase, ecto-ATP difosfohidrolase, ecto-ADPase) hidroliza de forma semelhante ATP e ADP (razão de hidrólise ATP:ADP = 1:0,8), a NTPDase 2 (CD39L1, ecto-ATPase) tem forte preferência por ATP (ATP:ADP = 1:0,03), a NTPDase 3 (CD39L3, HB6) e a NTPDase 8 (ecto-ATP-difosfohidrolase, ecto-ATPDase, ecto-apirase) preferem ATP ao ADP, na proporção 3:1 e 2:1, respectivamente. As NTPDases 4 (UDPase do Golgi, LALP70v) e 7 (LALP1), estão ligadas à membrana de organelas, a NTPDase 4, possui duas formas, uma ancorada no aparato de Golgi e outra ligada em vacúolos lisossomais/autofágicos, possuindo alta afinidade por UDP, hidrolisando outros nucleotídeos tri- e difosfatados, mas não ATP e ADP, e a NTPDase 7 está localizada em vesículas intracelulares e prefere nucleotídeos trifosfatados. As NTPDases 5 (CD39L4, UDPase do RE) e 6 (CD39L2) estão localizadas intracelularmente, permitindo secreção da forma solúvel após clivagem proteolítica, ambas com preferência por nucleotídeos difosfatados (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON *et al.*, 2006; KNOWLES, 2011).

### **I.3.2.2 Ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5)**

A enzima ecto-5'-nucleotidase, representa um marcador de maturação de linfócitos T e B, CD73. Além disso, é amplamente distribuída nos tecidos e está envolvida em diferentes funções, como na adesão celular. Há relatos da presença da

ecto-5'-nucleotidase em vertebrados, bactérias, protozoários e plantas (ZIMMERMANN, 2001).

A ecto-5'-nucleotidase participa da cascata enzimática dos nucleotídeos extracelulares, levando à formação de nucleosídeos e fosfato livre a partir de nucleosídeos 5'-monofosfatados, sendo o AMP o nucleotídeo de maior preferência. A ecto-5'-nucleotidase é considerada a principal responsável pela produção de adenosina extracelular, que conseqüentemente levará à ativação de receptores P1. Esta enzima é classificada de acordo com sua localização celular e propriedades bioquímicas, podendo ser uma enzima ancorada à membrana plasmática via glicosilfosfatidil inositol (GPI) ou apresentar-se na forma solúvel, no meio extracelular ou no citoplasma (ZIMMERMANN, 1992).

### **I.3.3 Ectonucleotidases em *T. vaginalis***

Em *T. vaginalis*, assim como em outros parasitos, atribuem-se possíveis funções fisiológicas para as ectonucleotidases, que podem modular os níveis extracelulares de ATP e adenosina e assim contribuir para os mecanismos de evasão imune do parasito. E ainda, esta cadeia enzimática participa da via de salvação de purinas, uma vez que o parasito não realiza síntese *de novo* de purinas e pirimidinas e necessita recaptar adenosina do meio externo (MUNAGALA e WANG, 2003).

A enzima NTPDase foi caracterizada em *T. vaginalis*, onde a comparação entre as atividades da NTPDase em trofozoítos intactos e rompidos demonstrou a presença de uma enzima de superfície capaz de hidrolisar ATP e ADP, cuja atividade é  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  dependente (MATOS *et al.*, 2001). Investigações no genoma do parasito, revelaram a presença de genes que codificam proteínas com regiões similares a cinco ACRs, presentes em todas as NTPDases, sugerindo que um ou mais membros desta família de enzimas podem estar presentes em *T. vaginalis* e serem responsáveis pela atividade de NTPDase. Além disso, todas as proteínas codificadas por estes genes apresentam domínios transmembrana na região C-terminal e atividade extracelular, indicando que estas proteínas estão ancoradas à membrana celular e atuam como ecto-enzimas (TASCA *et al.*, 2004; SANSOM *et al.*, 2008). A enzima ecto-5'-nucleotidase também foi caracterizada em *T. vaginalis*, onde os trofozoítos apresentaram atividade hidrolítica a uma série de nucleotídeos monofosfatados, preferencialmente AMP, não dependendo de cátions divalentes, porém com aumento da hidrólise na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$

(TASCA *et al.*, 2003). Curiosamente, alguns isolados não apresentaram atividade da ecto-5'-nucleotidase, o que pode resultar em infecção aguda e um aumento na sintomatologia da tricomonose, pela baixa concentração de adenosina no sítio da infecção (TASCA *et al.*, 2005).

Vários estudos demonstraram que fatores ambientais podem influenciar na atividade das ectonucleotidases em *T. vaginalis*, relacionando estas enzimas com fatores de virulência e patogenicidade do protozoário. Quando comparados, isolados clínicos frescos com isolados cultivados *in vitro* por longos períodos de tempo, verificou-se que os primeiros apresentaram uma maior atividade da NTPDase, sugerindo que a enzima tem importante papel na virulência do parasito (TASCA *et al.*, 2005). As constantes modificações nas concentrações de estrogênios do ambiente vaginal, podem modular a atividade da NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase, controlando os níveis de ATP e adenosina no sítio de infecção, influenciando na colonização e no estabelecimento da patologia (RÜCKERT *et al.*, 2009; 2010). Ademais, Frasson e colaboradores (2012b), num estudo avaliando a produção de óxido nítrico (NO) por neutrófilos estimulados por *T. vaginalis*, concluíram que principalmente a enzima ecto-5'-nucleotidase está envolvida na produção de óxido nítrico (NO). Nas condições utilizadas no estudo, ATP e ADP não alteraram a produção de NO, ao contrário da adenosina e inosina que reduziram a produção de NO, através da ativação do receptor A<sub>2A</sub>, favorecendo o parasitismo uma vez que o NO exerce efeitos tóxicos aos trofozoítos. Estes resultados mimetizam o que ocorre no sítio de infecção, já que os neutrófilos são a primeira linha de defesa contra *T. vaginalis*, contribuindo para o entendimento da interação parasito-hospedeiro e imunidade na tricomonose. Quanto ao efeito de nutrientes essenciais, na atividade das ectoenzimas, verificou-se que trofozoítos cultivados em meio enriquecido com ferro apresentaram um aumento na atividade da ecto-5'-nucleotidase e em meio com baixas concentrações deste cátion, a atividade da enzima diminuiu (TASCA *et al.*, 2005). Já em experimentos com trofozoítos cultivados sob limitação de soro, verificou-se uma profunda ativação das atividades de NTPDase e ecto-5'-nucleotidase (FRASSON *et al.*, 2012a). O ferro modula a expressão e síntese de vários fatores de virulência, assim como, o crescimento e multiplicação dos trofozoítos e o soro é importante fonte de nutrientes, como a adenosina, essencial para o crescimento do parasito (TASCA *et al.*, 2005; FRASSON *et al.*, 2012a). Neste contexto, é evidente a influência de nutrientes essenciais na atividade

das ectonucleotidasas e conseqüentemente, no processo de hidrólise do ATP e produção de adenosina, importante para o estabelecimento e manutenção da infecção.

A concentração de nucleotídeos extracelulares no meio vaginal, secretados pelas CEVs durante a infecção por *T. vaginalis* pode chegar a 10 mM, com aproximadamente 90 % de ATP. O ATP extracelular é citolítico para células mamíferas, porém, interessante os trofozoítos mantêm-se vivos, provavelmente pela ação das ectonucleotidasas, que degradando os nucleotídeos extracelulares, conferem proteção aos efeitos pro-inflamatórios do ATP extracelular e aumentam os níveis de adenosina, produzindo efeito anti-inflamatório no sítio de infecção, auxiliando no processo de evasão imune e também, sendo recaptada para a síntese de nucleotídeos e conseqüente incorporação em ácidos nucléicos, já que o parasito não sintetiza *de novo* purinas (MUNAGALA e WANG, 2003). Estes fatores, decorrentes da atividade das ectonucleotidasas em *T. vaginalis*, contribuem para a sobrevivência e manutenção do parasitismo. Possivelmente, estas enzimas podem ser consideradas marcadores patogênicos para este parasito e novos alvos terapêuticos, oferecendo alternativas para o tratamento da tricomonose.

#### **I.3.4 Adenosina deaminase (ADA, EC 3.5.4.4)**

A adenosina, por participar da rede de sinalização do sistema purinérgico, tem sua concentração extracelular muito bem controlada, ou pela captação via transportadores bidirecionais, seguida pela fosforilação de AMP pela adenosina quinase no meio intracelular ou, pela deaminação à inosina pela ADA, em ambos os meios intra ou extracelular. Sendo assim, a ADA participa do metabolismo de purinas, catalisando a deaminação hidrolítica irreversível de adenosina ou 2'-deoxiadenosina, à inosina ou 2'-deoxinosina, respectivamente (FRANCO *et al.*, 1997; YEGUTKIN, 2008).

A atividade da ADA é observada em vários tecidos humanos em três diferentes isoformas: i) a ADA1, citosólica, com peso molecular de aproximadamente 41-kDa e sua deficiência resulta em doença imune; ii) a ADA complexada, localizada na membrana celular, também chamada de ecto-ADA, sendo um complexo proteico de ADA1 ancorada à glicoproteína de membrana CD26, com 280-kDa, ou, ADA1 ancorada com a receptores A<sub>1</sub> de adenosina, que regula os níveis de adenosina extracelular (FRANCO *et al.*, 1998), e; iii) ADA 2, com 114-kDa, que parece ser



secretada, representa a principal atividade de ADA no soro humano, pode estar ativa na inflamação, durante a anóxia e em áreas de crescimento tumoral (UNGERER, 1992; YEGUTKIN, 2008). Além destas isoformas, análises filogenéticas revelaram uma sequência de aminoácidos similar à ADA, denominada ADA-like (ADAL), com função desconhecida (MAIER *et al.*, 2005). Um estudo da estrutura tridimensional da ADA de rato revelou que a enzima dispõe de uma estrutura  $\alpha$ - $\beta$  barril paralelo, com oito cadeias  $\beta$  centrais, oito  $\alpha$  hélices periféricas e um íon zinco no sítio catalítico. Vários resíduos importantes também foram identificados, como His15, His17 e His214, indicando influência na ligação do zinco e His17, Gli184, Glu217, His238 e Asp296, doando ou aceitando um hidrogênio durante ligação no sítio ativo (WILSON *et al.*, 1991).

A ADA tem papel considerável na regulação do crescimento e diferenciação celular, sendo uma molécula sinalizadora importante de vários eventos (LINDEN, 2001). A ADA citosólica tem sido objeto de interesse em muitos estudos, pois a deficiência congênita desta enzima em humanos causa a doença da imunodeficiência severa, resultando basicamente em uma linfopenia grave e imunodeficiência pelo dano causado à função de células T e B, que provavelmente, são sensíveis ao aumento das concentrações de adenosina e de 2'-deoxiadenosina (BLACKBURN, 2005). Em células sanguíneas periféricas a ADA é encontrada como ectoenzima na maioria dos monócitos e linfócitos B, alguns linfócitos T (10-20 %), também sendo encontrada na superfície de células epiteliais (FRANCO *et al.*, 1997; GONZALEZ-GRONOW, *et al.*, 2004). Além de células e tecidos humanos, vários estudos caracterizaram, localizaram e apontaram a importância da atividade da ADA em diferentes mamíferos, insetos hematófagos, como *Lutzomyia longipalpis*, *Phlebotomus duboscqi*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, no molusco *Biomphalaria glabrata*, nas bactérias *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* e nos parasitos *Plasmodium lophurae*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma evansi*, *Trichinella spiralis*, *Fasciola gigantica*, *Hyalomma dromedarii*, assim como, *T. vaginalis* (RIBEIRO *et al.*, 2001, VALE *et al.*, 2005; KATO *et al.*, 2006; DOWNIE *et al.*, 2008; WEIZENMANN *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011; MILLER *et al.*, 2012).

#### **I.3.4.1 Adenosina deaminase em *T. vaginalis***

A presença da ADA em *T. vaginalis* foi primeiramente citada em um estudo de caracterização e expressão de S-adenosilhomocisteína, a qual cataliza a hidrólise reversível de S-adenosilhomocisteína à homocisteína e adenosina, onde estudos preliminares utilizando os inibidores da ADA: 2'-deoxicoformicina e eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina (EHNA) constataram a ausência ou mínima atividade da ADA (MINOTTO *et al.*, 1998). Posteriormente, as atividades da ADA, IMP desidrogenase e GMP sintetase foram identificadas em trofozoítos lisados de *T. vaginalis*, num estudo que demonstrou que adenosina é o precursor primário de todo o *pool* de nucleotídeos de purinas neste protozoário, já que *T. vaginalis* não sintetiza nucleosídeos *de novo*, dependendo de vias para captação, sugerindo uma via metabólica capaz de converter adenina à adenosina, e esta, à GMP (MUNAGALA e WANG, 2003). Weizenmann e colaboradores (2011) realizaram a caracterização cinética e a expressão gênica da ADA em trofozoítos intactos de *T. vaginalis*, assim como, a análise do efeito do inibidor EHNA na atividade enzimática e na produção de NO por neutrófilos durante a interação com *T. vaginalis*. Os resultados deste estudo sugerem que a atividade desta enzima pode estar envolvida no processo inflamatório gerado durante a infecção, pois o ATP extracelular é pró-inflamatório, estimulando neutrófilos presentes no sítio de infecção a liberar NO e, inversamente, a adenosina e a inosina, esta última produto da atividade da ADA, inibem a secreção de NO, apresentando um efeito anti-inflamatório, o que colabora com a evasão do sistema imune do hospedeiro. Como citado acima, poucos são os relatos da atividade da ADA em *T. vaginalis*, havendo ainda muitos questionamentos sobre a colaboração desta enzima na sobrevivência do parasito. Aspectos como o efeito de nutrientes essenciais na atividade enzimática e na expressão gênica, assim como, a localização celular da ADA, até então não foram analisados.

Considerando (i) a alta prevalência e o impacto da tricomonose na saúde pública; (ii) a complexidade da relação parasito-hospedeiro ainda não totalmente compreendida; (iii) a necessidade da captação de nutrientes essenciais, como o ferro e purinas no estabelecimento e manutenção da patologia; (iv) o papel dos nucleotídeos e nucleosídeos na inflamação; (v) a caracterização das enzimas que compõem o sistema purinérgico em *T. vaginalis*, e; (vi) a necessidade da investigação de novos alvos terapêuticos para o tratamento da tricomonose, faz-se necessário maiores estudos sobre sistema purinérgico em *T. vaginalis*.

## **II. Objetivos**

---



Os objetivos gerais dos estudos desta dissertação foram:

- Investigar a localização celular da ADA em *T. vaginalis*;
- Investigar o efeito de nutrientes essenciais na atividade da ADA de *T. vaginalis*.

Os objetivos específicos propostos foram:

- Realizar a predição da localização da ADA em *T. vaginalis* utilizando o programa PSORT II;
- Determinar a imunolocalização da ADA em *T. vaginalis*;
- Avaliar a atividade enzimática da ADA em *T. vaginalis*, sob uma condição de limitação de soro;
- Verificar o efeito do ferro proveniente de sulfato ferroso, hemoglobina e hemina e do quelante bipyridil na atividade enzimática e na expressão gênica da ADA de *T. vaginalis*.



### **III. Artigo científico**

---





**III.1 CAPÍTULO 1** - Muriel Primon de Barros, Graziela de Vargas Rigo, Amanda Piccoli Frasson, Odelta dos Santos, Lisiane Smiderle, Silvana Almeida, Geraldo Attílio de Carli, Alexandre José Macedo, Tiana Tasca. Adenosine deaminase in *Trichomonas vaginalis*: cellular localization and effect of essential nutrients.

Artigo a ser submetido para o periódico *Molecular and Biochemical Parasitology*.



## **IV. Discussão Geral**

---



A tricomonose é causada pelo protozoário *T. vaginalis*, sendo a doença sexualmente transmissível (DST) de origem não viral mais comum no mundo. A prevalência desta patologia é de 187 milhões de casos, porém a falta de estudos epidemiológicos e métodos de diagnóstico pouco sensíveis tornam esses dados subestimados (WHO, 2012). Após a colonização do trato urogenital humano, vaginite, uretrite e prostatite constituem a sintomatologia mais comum e complicações decorrentes à patologia como infertilidade, câncer cervical, dificuldades na gravidez, nascimento prematuro e aumento da suscetibilidade ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) são relatadas (FIGUROA-ANGULO *et al.*, 2012). O tratamento da tricomonose é limitado, com apenas dois fármacos aprovados pelo FDA, o metronidazol e o tinidazol, ambos pertencentes à classe dos 5-nitroimidazóis. Apesar de o metronidazol ser o fármaco de escolha na terapêutica, diversos efeitos colaterais são associados a sua utilização (KULDA *et al.*, 1999). Além disso, estudos apontam outro agravante relacionado à terapêutica, a emergente resistência, em cerca de 9,6 % dos isolados, frente aos fármacos citados acima (SCHWEBKE e BURGESS, 2004). Inúmeros casos clínicos de parasitos resistentes aos fármacos têm sido relatados, sendo a ocorrência de resistência na tricomonose superior quando comparada a infecções por *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e outros protozoários patogênicos cujo tratamento segue o mesmo esquema terapêutico (ALI e NOZAKI, 2007). Considerando a prevalência de 187 milhões de casos de tricomonose no mundo, o número de casos resistentes é preocupante, requerendo alternativas para um tratamento seguro e eficaz desta DST, já que atualmente não existem outras fontes terapêuticas disponíveis. A investigação de novos compostos anti-*T. vaginalis* com estrutura e mecanismo de ação distintos dos 5-nitroimidazóis é uma estratégia para inovação no tratamento da doença. Estudos de Giordani e colaboradores (2010, 2011) demonstraram a citotoxicidade e possíveis vias de ação de moléculas isoladas de plantas com promissora atividade anti-*T. vaginalis*. Paralelamente, a investigação de novos alvos terapêuticos é uma abordagem eficiente e capaz de conduzir a descoberta de novos agentes antiparasitários.

A caracterização detalhada de proteínas ou macromoléculas como potenciais alvos terapêuticos, assim como a investigação de inibidores seletivos para tais, sustentam uma abordagem racional para a quimioterapia antiparasitária. As vias bioquímicas presentes nos organismos patogênicos e divergentes ou ausentes em seus hospedeiros são sempre potenciais alvos para a pesquisa de moléculas ativas (DATTA *et al.*, 2008). Neste contexto, o entendimento da fisiologia e bioquímica envolvidas na

biologia do parasito colabora para a prospecção de novos alvos terapêuticos. Os avanços nas áreas de biologia celular, molecular e estrutural, assim como, o entendimento das vias bioquímicas, alcançados principalmente pela possibilidade do cultivo *in vitro* de parasitos de importância na medicina humana, permitem a identificação de enzimas ou receptores essenciais para a sobrevivência e crescimento do patógeno, fornecendo subsídios para a caracterização de novos alvos que atuem especificamente sobre o microrganismo. Porém, o sucesso do parasitismo, ditado pelo estabelecimento e manutenção da patologia é decorrente de um processo evolutivo de seleção de rotas metabólicas e enzimas do parasito que estejam adaptadas à sobrevivência no interior do hospedeiro (MANSOUR, 2002; DATTA *et al.*, 2008). Assim, mais pesquisas devem ser conduzidas na tentativa de traçar diferenças entre os organismos, como por exemplo, o estudo de alvos enzimáticos, contidos em centenas de rotas metabólicas, que cooperam entre si para a manutenção da viabilidade e funcionalidade celular e que podem apresentar distinções de nível estrutural, cinético ou ainda, quanto à sensibilidade a inibidores, em relação ao hospedeiro (WANG, 1997; PINK *et al.*, 2005). Neste sentido, um alvo terapêutico é considerado ideal quando (i) está presente unicamente no patógeno ou possui características divergentes do hospedeiro; (ii) é essencial para sobrevivência, crescimento e reprodução do organismo; (iii) existe baixo potencial para o desenvolvimento de resistência; (iv) é a enzima limitante em uma rota metabólica e; (v) possui toxicidade seletiva ao parasito (PINK *et al.*, 2005; DATTA *et al.*, 2008).

O sistema purinérgico vem sendo cada vez mais estudado em diversos parasitos, por influenciar as funções essenciais à sobrevivência e o estabelecimento da infecção (SANSOM *et al.*, 2008). A liberação de nucleotídeos para o espaço extracelular possibilita a produção de uma série de nucleotídeos intermediários e nucleosídeos, através da atividade de enzimas que compõem a cascata purinérgica que controlam dinamicamente os níveis de purinas extracelulares, fundamentais para os parasitos, na síntese de ácidos nucléicos, proteínas e outros compostos, após recaptação (BURNSTOCK, 1976; ZIMMERMANN, 2001; MUNAGALA e WANG, 2003). Além disso, na interação parasito-hospedeiro, durante a infecção, o ATP e adenosina desempenham funções sinalizadoras através da ativação de um grande número de receptores de membrana denominados purinoceptores (BURNSTOCK, 1976; GOUNARIS e SELKIK, 2005). A investigação do sistema purinérgico em parasitos patogênicos desperta interesse, uma vez que contribui para a compreensão de seus aspectos bioquímicos, assim como, de sua relação com o hospedeiro.

Em *T. vaginalis*, estudos prévios caracterizaram as enzimas NTPDase (MATOS *et al.*, 2001), ecto-5'-nucleotidase (TASCA *et al.*, 2003) e adenosina deaminase em trofozoítos intactos de *T. vaginalis* (WEIZENMANN *et al.*, 2011), sugerindo que estas poderiam exercer suporte para o desenvolvimento da infecção. A presença destas enzimas indica um papel importante na receptação de nucleosídeos púricos e pirimídicos, considerando que o parasito é incapaz de sintetizar *de novo* estas moléculas, dependendo assim das vias de salvação (HEYWORTH *et al.*, 1982; 1984). Além disso, aborda-se o envolvimento da atividade destas enzimas na modulação do sistema imune do hospedeiro, visto que, durante a infecção o ATP liberado para o meio extracelular desempenha um papel pró-inflamatório, como sinalizador no recrutamento de células imunes, principalmente neutrófilos (FRASSON *et al.*, 2012b). Com a hidrólise do ATP e consecutiva formação de adenosina, a qual medeia uma reação oposta, ou seja, anti-inflamatória, o parasitismo é favorecido e a possibilidade de sobrevivência torna-se maior, evidenciando a importância da sinalização purinérgica para o parasito (GOUNARIS e SELKIK, 2005). Estas enzimas distinguem-se entre si, principalmente no que diz respeito à especificidade por substrato (ZIMMERMANN, 1992; 2001) oferecendo desta forma, a possibilidade de serem exploradas como potenciais alvos para o desenvolvimento de agentes antiparasitários.

A ADA faz parte da sinalização purinérgica, degradando adenosina em inosina (FRANCO, 1997). Os efeitos anti-inflamatórios da adenosina extracelular, em decorrência da ligação a seus receptores específicos já estão bem estabelecidos. Com relação à inosina, alguns estudos relataram sua ligação de maneira diferenciada a receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> da adenosina, o que acarreta distintos efeitos *in vivo*. A ação imunomodulatória da inosina é consequência da ligação direta deste nucleosídeo nos receptores A<sub>2A</sub> da adenosina (GOMEZ e SITKOVSKY, 2003; HASKÓ *et al.*, 2004). Marton e colaboradores (2001) constataram em seus experimentos os efeitos anti-inflamatórios *in vitro* da inosina em monócitos, neutrófilos e células epiteliais humanas, pela supressão de mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-8, assim como, pela atenuação da produção de superóxido em neutrófilos ativados. Na tricomonose os neutrófilos são as primeiras células de defesa recrutadas no sítio de infecção e o contato com os trofozoítos de *T. vaginalis* estimulam a liberação pelos neutrófilos de IL-8, um quimioatraente imune e de NO, um efetivo agente citotóxico (RYU *et al.*, 2004; FRASSON *et al.*, 2012b). Estudos recentes relataram que adenosina e inosina em contato com *T. vaginalis* diminuem a produção de NO por neutrófilos humanos, o que

indica o envolvimento das enzimas da cascata purinérgica, inclusive da ADA, no processo inflamatório gerado durante a infecção (WEIZENMANN *et al.*, 2011; FRASSON *et al.*, 2012b).

Diante do contexto apresentado, primeiramente abordou-se nesta dissertação a investigação da localização celular da ADA em trofozoítos de *T. vaginalis*, através da predição do sítio de localização pelo programa PSORT II, utilizando a sequência de aminoácidos de dois genes para ADA, em que uma das sequências apresentou-se com localização indeterminada e a outra sequência apresentou-se com uma predição de 73,9 % no citoplasma. As predições apresentadas, em menor proporção, da enzima em vacúolos ou em vesículas de secreção presentes em *T. vaginalis*, também devem ser consideradas, pois podem indicar uma possível realocação da enzima na membrana celular ou secreção para o meio extracelular. Corroborando com os resultados obtidos na predição computacional, a imunolocalização da ADA foi realizada através de microscopia de fluorescência confocal, utilizando um anticorpo anti-adenosina deaminase de rato. Os resultados obtidos com trofozoítos permeabilizados indicaram a presença de imunofluorescência na porção intracelular, sendo possível assim, verificar a localização da ADA no meio citoplasmático. Ainda, trofozoítos não permeabilizados também apresentaram fluorescência, indiciando a presença da enzima na membrana plasmática do parasito. Em ambas as condições foi possível a visualização de pontos específicos de fluorescência, inclusive na porção flagelar do protozoário, não descartando assim, a hipótese da enzima estar contida em vacúolos ou vesículas.

Em um estudo recente da localização da enzima arginina deaminase (ADI) em *T. vaginalis*, três sequências de aminoácidos foram utilizadas em análises com o programa PSORT II e a predição computacional foi de 56 a 65 % hidrogenossomal para estas sequências, sendo que esses resultados foram ao encontro da posterior imunolocalização da enzima nos hidrogenossomos, utilizando um anticorpo com hemaglutinina conjugada na porção *c*-terminal (MORADA *et al.*, 2011). Ainda, Vargas-Villarreal e colaboradores (2003) identificaram a enzima fosfolipase-A, com função hemolítica em *T. vaginalis*, em vacúolos, vesículas e hidrogenossomos após fracionamento subcelular, estendendo relatos anteriores de hemólise contato-dependente por parasitos intactos, o que indica uma migração da enzima para a membrana celular. Outros estudos também relatam que as adesinas AP120, AP65, AP51 e AP33, envolvidas na adesão do parasito às CEVs apresentam homologia com as enzimas metabólicas, piruvato:ferredoxina oxidorrredutase, enzima málica e subunidades  $\alpha$ - e  $\beta$ - succinil-CoA sintetase,



respectivamente. Estas adesinas são expressas por uma família multigene e foram identificadas e caracterizadas como proteínas multifuncionais, com funções diferentes dependendo da localização. A realocização destas enzimas hidrogenossomais para a superfície é sustentada pela hipótese da autofagia hidrogenossomal, a qual já foi mostrada em uma destas enzimas, a PFO/AP120 (ALDERETE *et al.*, 2001; MORENO-BRITO *et al.*, 2005; MEZA-CERVANTEZ *et al.*, 2011). Levando em consideração os estudos anteriores, a possibilidade da ADA estar localizada em mais que uma porção celular ou estar sendo realocizada não pode ser descartada, visto que, sua atividade já foi relatada tanto em trofozoítos lisados, quanto em trofozoítos intactos (MUNAGALA e WANG; 2003; WEIZENMANN *et al.*, 2011).

Estudos de localização celular da ADA foram realizados em diferentes organismos. Por imunohistoquímica a ADA foi encontrada principalmente nas frações citoplasmáticas de diversas populações neuronais, em cérebro de vários mamíferos como ratos, camundongos, cobaios e coelhos (YAMAMOTO *et al.*, 1987). A presença da ADA na membrana celular, também chamada de ecto-ADA é conhecida em células do sistema nervoso, monócitos, eritrócitos e linfócitos B e T (BIELAT e TRITSCH, 1989; FRANCO, 1997). Em peixes do tipo *goldfish* e *zebrafish* a ADA foi verificada em porções de citoplasma e membrana celular (BERAUDI *et al.*, 2003; ROSEMBERG *et al.*, 2008). Em parasitos, a presença da ADA foi confirmada nos protozoários *Trypanosoma evansi*, *Plasmodium lophurae*, *Plasmodium falciparum*, no trematódeo *Fasciola gigantica*, no nematóide *Trichinella spiralis* e em *Hyalomma dromedarii*, uma espécie de carrapato de camelos (FRANCO *et al.*, 1997; GOUNARIS, 2002; MOHAMED, 2006; ALI, 2008; DOWNIE, 2008; SILVA *et al.*, 2011). Porém, em nenhum destes estudos a localização celular desta enzima foi detectada, sendo inédito o estudo apresentado nesta dissertação.

Com a finalidade de melhor compreender o efeito de nutrientes essenciais na atividade da ADA, testes com limitação de soro e com diferentes fontes de ferro ou limitação desde elemento foram realizados, utilizando isolados ATCC e clínicos frescos provenientes de pacientes dos sexos feminino e masculino, a fim de avaliar uma possível heterogeneidade dos diferentes isolados sob as condições propostas. Com relação ao teste de limitação de soro, considerando que os trofozoítos de *T. vaginalis* não realizam síntese *de novo* de nucleosídeos púricos e que o soro adicionado ao meio de cultura é uma fonte de moléculas importantes à sobrevivência dos trofozoítos, principalmente de adenosina, foi observado o mesmo perfil em todos os isolados de *T.*

*vaginalis* cultivados na condição soro limitada, mantendo a atividade da ADA semelhante ao controle. Este resultado vem de acordo com recentes testes realizados por Frasson e colaboradores (2012a), que constataram um aumento da atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, com maior hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP nos parasitos cultivados em soro a 1.0 % comparado ao grupo controle, o que compensaria os níveis requeridos de adenosina, não modificando a atividade enzimática da ADA.

Em relação aos experimentos realizados com o objetivo de verificar a influência do ferro ou de sua privação na atividade da ADA, os trofozoítos de *T. vaginalis* foram submetidos a diferentes condições: i) controle, cultivados com meio TYM suplementado com 10.0 % de soro bovino adulto; ii) baixa concentração de ferro, utilizando o quelante bupiridil; iii) alta concentração de ferro, utilizando sulfato ferroso; iv) hemoglobina, e; v) hemina, estes dois últimos tratamentos, como duas fontes de ferro que estão presentes no meio vaginal durante o percurso da infecção. Em um estudo anterior do grupo de pesquisa, foi realizada a curva cinética de crescimento destes isolados, sob as condições mencionadas, constatando diferenças no perfil de crescimento, onde as condições que forneciam ferro (sulfato ferroso, hemoglobina e hemina) sustentaram o crescimento dos isolados, com pico no número de trofozoítos em 24 h, similar ao controle. No entanto, na condição de baixa concentração de ferro, observou-se redução no crescimento dos isolados, indicando assim a influência da privação deste elemento no metabolismo dos trofozoítos (dados não publicados). No que diz respeito à atividade da ADA, foi possível verificar uma diminuição significativa no tratamento com baixa concentração de ferro e atividade parecida com a dos controles nas demais condições, onde após 24 h em contato com as fontes que forneciam ferro a atividade foi reestabelecida. Este fenômeno vem ao encontro dos achados de Tasca e colaboradores (2005), onde diferentes isolados de *T. vaginalis*, sob os tratamentos com alta ou baixa oferta de ferro, não apresentaram alterações na atividade da enzima NTPD-ase, porém, a enzima ecto-5'-nucleotidase apresentou atividade diminuída após a privação do ferro e inalterada após tratamento com alta concentração deste cátion. Em um estudo similar, De Jesus e colaboradores (2006) verificaram a influência do ferro nas enzimas ecto-ATPase e ecto-fosfatase, constatando a diminuição das atividades enzimáticas na privação de ferro e atividades reestabelecidas após 24 h de tratamento com altas concentrações deste elemento. Nos dois estudos anteriores é evidente que a hidrólise de nucleotídeos está diminuída quando o ferro é escasso e por consequência, a

oferta de adenosina extracelular é menor. A diminuição da deaminação da adenosina à inosina, pela menor atividade da ADA sob baixas concentrações de ferro, constatada nesta dissertação, corrobora com os achados anteriores, considerando que a adenosina é rapidamente recaptada por ser o precursor de todo o *pool* de nucleotídeos púricos em *T. vaginalis* (HARRIS *et al.*, 1988; MUNAGALA e WANG, 2003). Neste contexto, o ferro pode atuar como um modulador da atividade das enzimas que hidrolizam nucleotídeos e nucleosídeos púricos.

Na tentativa de elucidar o mecanismo envolvido na diminuição da atividade da ADA perante o cultivo com limitação de ferro, o controle transcricional da enzima foi avaliado através da análise da expressão gênica de duas sequências correspondentes encontradas no genoma do parasito. Em todos os isolados utilizados a limitação de ferro foi capaz de regular a nível transcricional a expressão da ADA, promovendo surpreendentemente um aumento dos níveis de RNA mensageiro. O conceito de que a quantidade de RNA mensageiro deve ser proporcional à atividade enzimática vem mostrando-se divergente com o avanço de pesquisas inovadoras, principalmente nas áreas de proteômica e de sequenciamento do DNA. Dados atuais demonstram que tanto em bactérias, quanto em eucariotos, aproximadamente 40 % da quantidade de proteína produzida é relacionada aos valores de RNA mensageiro encontrados, porém, nos 60 % restantes, o RNA mensageiro sofre regulação pós-transcricional, que pode incluir: i) interferências durante a tradução, pela ação de proteínas que se ligam ao RNA (*RNA-binding*) ou do RNA de interferência (*miRNA*), ou ainda; ii) degradação da proteína traduzida, por outras proteínas (VOGEL e MARCOTTE, 2012). Estudos envolvendo fungos e bactérias constataram que os níveis de RNA mensageiro e de proteína, sofreram regulação pós-transcricional em resposta à perturbação em situações de estresse oxidativo e osmolaridade (LEE *et al.*, 2011; VOGEL *et al.*, 2011). A falta de ferro no meio de cultivo faz com que os trofozoítos de *T. vaginalis* encontrem-se em uma situação de estresse, sendo possível desta forma, justificar a relação transcrição/atividade da enzima ADA.

Ademais, diversos autores relataram que a falta ou excesso de ferro podem modular a expressão gênica de adesinas, proteínas imunogênicas, cisteínopterases e proteínas metabólicas hidrogenossomais em *T. vaginalis* (TORRES-ROMERO e ARROYO, 2009). Em um estudo proteômico focado em trofozoítos de *T. vaginalis* cultivados em altas ou baixas concentrações de ferro, alterações no perfil do proteoma foram constatadas. Por espectrometria de massas, 600 - 640 pontos foram detectados

em géis com amostras obtidas a partir de trofozoítos cultivados em alta concentração de ferro e 540 - 570 pontos foram encontrados nas amostras cultivadas em baixas concentrações. Entre as proteínas expressas por parasitos submetidos a esta última condição, 12 apresentaram-se com expressão aumentada, 19 com expressão diminuída e 11 com expressão abolida (DE JESUS *et al.*, 2007). O aumento da transcrição e a diminuição da atividade da ADA em decorrência da privação de ferro demonstrados, reforçam a hipótese que este elemento pode modular a atividade das enzimas envolvidas na sinalização purinérgica, já que o ambiente vaginal está sob constantes mudanças e os níveis de ferro neste local sofrem influência do ciclo menstrual, em que estas enzimas dependem de uma precisa regulação da expressão gênica para rápidas adaptações ao meio ambiente e desenvolvimento de mudanças para garantir a sobrevivência do parasito (FIGUERO-ANGULO *et al.*, 2012).

Finalmente, a abordagem desta dissertação permitiu a avaliação de importantes aspectos da enzima ADA, que colaboram para o melhor entendimento do sistema purinérgico em *T. vaginalis*. No mundo, vários grupos de pesquisa investigam o sistema purinérgico em protozoários, porém existem poucos relatos sobre a caracterização da ADA nestes organismos e nunca antes foi descrito a localização celular ou influência das concentrações de nutrientes na atividade enzimática. Desta forma, os achados aqui apresentados trazem contribuições inéditas sobre o metabolismo dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares de *T. vaginalis*, com a investigação de um sistema bioquímico que colabora com o estabelecimento e manutenção da infecção e consequente sobrevivência de *T. vaginalis*.

## **V. Conclusões Gerais**

---



Os resultados obtidos durante o desenvolvimento desta dissertação permitem as seguintes conclusões:

- Em *T. vaginalis*, a localização da ADA, verificada por predição computacional e por imunofluorescência, foi demonstrada no citoplasma e na membrana celular;
- O cultivo de *T. vaginalis* em uma condição de limitação de soro bovino, com diminuída oferta de nutrientes, principalmente adenosina, não influenciou na atividade da ADA;
- A limitação de ferro durante o cultivo através do tratamento com o quelante de ferro bipyridil diminuiu a atividade enzimática da ADA e aumentou a expressão gênica da enzima, indicando assim a modulação enzimática exercida pelo ferro;
- A enzima ADA, juntamente com as outras enzimas que compõem a cascata purinérgica, NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, podem ser consideradas em *T. vaginalis* potenciais alvos terapêuticos para o desenvolvimento racional de novos fármacos para o tratamento da tricomonose.





## **VI. Perspectivas**

---



A continuidade dos estudos acerca do envolvimento da enzima ADA na sinalização purinérgica durante a infecção por *T. vaginalis* permite algumas perspectivas:

- Realização de fracionamento subcelular de *T. vaginalis* com aplicação de técnicas de HPLC, imunoblotting e ELISA nas frações obtidas para confirmar os achados de localização da predição computacional e de imunofluorescência;
- Análise da atividade enzimática e expressão gênica da ADA em trofozoítos de *T. vaginalis* tratados com outros quelantes de ferro, como a ferrozina;
- Avaliação da citotoxicidade dos trofozoítos de *T. vaginalis* às células epiteliais vaginais após tratamento com biperidil e ferrozina (quelantes de ferro).



## **VII. Referências**

---



- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A.; ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences*, v. 32, p. 19–29, 2009.
- ABRAHAM, M. C.; DESJARDINS, M.; FILION, L. G.; GARBER, G. E. Inducible immunity to *Trichomonas vaginalis* in a mouse model of vaginal infection. *Infection and Immunity*, v. 64, p. 3571-3575, 1996.
- ALDERETE, J. F. Iron Modulates Phenotypic Variation and Phosphorylation of P270 in Double-Stranded RNA Virus-Infected *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, v. 67, p. 4298-4302, 1999.
- ALDERETE J.F.; PEARLMAN E. Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. *British Journal of Venereal Diseases*, v. 60 p. 99-105, 1984.
- ALDERETE, J. F.; ARROYO, R.; LEHKER, M. W. Analysis for adhesins and specific cytoadhesion of *Trichomonas vaginalis*. *Methods in Enzymology*, v. 253, p. 407-414, 1995.
- ALDERETE, J. F.; MILLSAP, K. W.; LEHKER, M. W.; BENCHIMOL, M. Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cell Microbiology*, v. 3, p. 359-370, 2001.
- ALI, E. M. M. *Fasciola gigantica*: Purification and characterization of adenosine deaminase. *Experimental Parasitology*, V 119, P. 285-290, 2008.
- ALI, V.; NOZAKI, T. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-Amino-Acid Metabolism as a Novel Target against Infections by “Amitochondriate” Protozoan Parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, p. 164-187, 2007.
- ARDALAN, S.; CRAIG LEE, B.; GARBER, G. E. *Trichomonas vaginalis*: The adhesins AP51 and AP65 bind heme and hemoglobin. *Experimental Parasitology*, v.121, n.4, p.300-306, 2009.

- ARROYO, R.; ALDERETE, J. F. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infection and Immunity*, v. 57, p. 2991-2997, 1989.
- BEACH, D. H.; HOLZ, J. G. G.; SINGH, B. N.; LINDMARK, D. G. Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 38, p. 175-190, 1990.
- BEACH, D. H.; HOLZ J. G. G.; SINGH, B. N.; LINDMARK, D. G. Phospholipid metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 44, p. 97-108, 1991.
- BENCHIMOL, M. Trichomonads under microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, v. 10, p. 528-550, 2004.
- BENCHIMOL, M. Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue Cell*, v. 41, p. 151-168, 2009.
- BERAUDI A.; TRAVERSA U.; VILLANI L.; SEKINO Y.; NAGY, J.I.; POLI A. Distribution and expression of A1 adenosine receptors, adenosine deaminase and adenosine deaminase-binding protein (CD26) in goldfish brain. *Neurochemistry International*, v. 42, p. 455-464, 2003.
- BHARDWAJ, R.; SKELLY, P. J. Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface? *Trends in Parasitology*, v. 25, p. 256-260, 2009.
- BIELAT, K.; TRITSCH, G. L. Ecto-enzyme activity of human erythrocyte adenosine deaminase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 86, p. 135-142, 1989.
- BLACKBURN, M.R.; KELLEMS, R.E. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Advances in Immunology*, v. 86, p. 1-41, 2005.



- BOURS, M. J. L.; SWENNEN, E. L. R.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B. N.; DAGNELIE, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 112, p. 358–404, 2006.
- BRAVO, R. S.; GIRALDO, P. C.; CARVALHO, N. S.; GABIATTI, J. R. E.; VAL, I. C. C.; GIRALDO, H. P. D.; PASSOS, M. D. L. Tricomoniase Vaginal: o que se passa? *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v. 22, p. 73-80, 2010.
- BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews*, v. 24, p. 509-581, 1972.
- BURNSTOCK, G. Purinergic receptors. *Journal of Theoretical Biology*, v. 62, p. 491-503, 1976.
- BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacological Reviews*, v. 58, p. 58-86, 2006a.
- BURNSTOCK, G. Purinergic signaling. *British Journal of Pharmacology*, v. 147, p. S172-S181, 2006b.
- BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews*, v. 87, p. 659-797, 2007.
- CARLTON, J. M.; HIRT, R. P.; SILVA, J. C.; DELCHER, A. L.; SCHATZ, M.; ZHAO, Q.; WORTMAN, J. R.; BIDWELL, S.L. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, v. 315, p. 207-212, 2007.
- CAUCI, S.; CULHANE, J. F. Modulation of vaginal immune response among pregnant women with bacterial vaginosis by *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and yeast. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 196, p. 133.e1-133.e7, 2007.

- CHERPES, T. L.; WIESENFELD, H. C.; MELAN, M. A.; KANT, J. A.; COSENTINO, L. A.; MEYN, L. A.; HILLIER, S. L. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive *Herpes simplex* virus type 2 serology. *Sexually Transmitted Disease*, v. 33, p. 747-752, 2006.
- COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, v. 1, p. 1397-1406, 2001.
- COTCH, M. F.; PASTOREK, J. G.; NUGENT, R. P.; YERG, D. E.; MARTIN, D. H.; ESCHENBACH, D. A. Demographic and behavioral predictors of *Trichomonas vaginalis* infection among pregnant women. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Obstetrics and Gynecology*, v. 78, p. 1087-1092, 1991.
- COTCH, M. F.; PASTOREK, J. G.; NUGENT, R.P.; HILLIER, S. L.; GIBBS, R. S.; MARTIN, D. H.; ESCHENBACH, D. A.; EDELMAN, R.; CAREY, J. C.; REGAN, J. A.; KROHN, M. A.; KLEBANOFF, M. A.; RAO, A. V.; RHOADS, G. G. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and prematurity study group. *Sexually Transmitted Disease*, v. 24, p. 353-60, 1997.
- CROUCH, M.L.; BENCHIMOL, M.; ALDERETE, J.F. Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* is influenced by iron and calcium. *Microbial Pathogenesis*, v. 31, p. 131-144, 2001.
- CUDMORE, S. L.; DELGATY, K. L.; HAYWARD-MCCLELLAND, S. F.; PETRIN, D. P.; GARBER, G. E. Treatment of infection caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, p. 783-793, 2004.
- DATTA, A. K.; DATTA, R.; SEM, B. Antiparasitic chemotherapy: tinkering with the purine salvage pathway. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 625, p. 116-132, 2008.

- DE CARLI, G. A. Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.
- DE JESUS, J. B.; FERREIRA, M. A.; CUERVO, P.; BRITTO, C.; COSTA E SILVAFILHO, F.; ROBERTO MEYER-FERNANDES, J. Iron modulates ectophosphohydrolase activities in pathogenic trichomonads. *Parasitology International*, v. 55, p. 285-290, 2006.
- DE JESUS, J. B.; CUERVO, P.; JUNQUEIRA, M.; BRITTO, C.; SILVA-FILHO, F.C.; SOARES, M.J.; CUPOLILLO, E.; FERNANDES, O.; DOMONT, G.B. A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics*, v 7, p. 1961-1972, 2007.
- DOWNIE, M. J.; KIRK, K.; MAMOUN, C. B. Purine salvage pathways in the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *EUKARYOTIC CELL*, v. 7,p. 1231-1237, 2008.
- DUNNE, R.L.; DUNN, L.A.; UPCROFT, P.; O'DONOGUHUE, P.J.; UPCROFT, J.A. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research*, v. 13, p. 239-249, 2003.
- FALK, S.; ULDALL, M.; HEEGAARD, A. The role of purinergic receptors in cancer-induced bone pain. *Journal of Osteoporosis*, v. 2012, p. 1-12, 2012.
- FICHOROVA, R. N.; TRIFONOVA, R. T.; GILBERT, R. O.; COSTELLO, C. E.; HAYES, G. R.; LUCAS, J. J.; SINGH, B. N. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infection and Immunity*, v. 74, p. 5773-5779, 2006.
- FICHOROVA, R. N. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 83, p. 185-189, 2009.

- FICHOROVA, R. N.; LEE, Y.; YAMAMOTO, H. S.; TAKAGI, Y.; HAYES, G. R.; GOODMAN, R. P.; CHEPA-LOTREA, X.; BUCK, O. R.; MURRAY, R.; KULA, T.; BEACH, D. H.; SINGH, B. N.; NIBERT, M. L. Endobiont viruses sensed by the human host - Beyond conventional antiparasitic therapy. *PlosOne*, v.7, p. 2-16, 2012.
- FIGUEROA-ANGULO, E. E.; RENDÓN-GANDARILLA, F. J.; PUENTE-RIVERA, J.; CALLA-CHOQUE, J. S.; CÁRDENAS-GUERRA, R. E.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; QUINTAS-GRANADOS, L. I.; ALVAREZ-SÁNCHEZ, M. E.; ARROYO, R. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection*, doi:10.1016/j.micinf.2012.09.004, 2012.
- FIORI, P. L.; RAPPELLI, P.; ROCCHIGIANI, A. M.; CAPPUCCINELLI, P. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. *FEMS Microbiology Letters*, v. 109, p.13–18, 1993.
- FRANCO, R.; CASADO, V.; CIRUELA, F.; SAURA, C.; MALLOL, J.; CANELA, E. I.; LLUIS, C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Progress in Neurobiology*, v. 52, p. 283-294, 1997.
- FRANCO, R.; MALLOL, J.; CASADO, V.; LLUIS, C.; CANELA, E. I.; SAURA, C.; BLANCO, J.; CIRUELA, F. Ecto-adenosine deaminase: an ectoenzyme and a costimulatory protein acting on a variety of cell surface receptors. *Drug Development Research*, v. 45, p. 261-268, 1998.
- FRASSON, A. P.; CHARÃO, M.F.; ROSEMBERG, D.B.; SOUZA, A.P.; GARCIA, S.C.; Cristina BONORINO, C.; BOGO, M.R.; DE CARLI, G.A.; TASCA, T. Analysis of the NTPDase and ecto-5'-nucleotidase profiles in serum-limited *Trichomonas vaginalis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 170-177, 2012a.
- FRASSON, A. P.; DE CARLI, G. A.; BONAN, C. D.; TASCA, T. Involvement of purinergic signaling on nitric oxide production by neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Purinergic Signalling*, v. 8, p. 1-9, 2012b.

- FREDHOLM, B. B. Physiological and pathophysiological roles of adenosine. *Sleep and Biological Rhythms*, v. 9, p. 24-28, 2011.
- GARCIA, A. F.; CHANG, T. H.; BENCHIMOL, M.; KLUMPP, D. J.; LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology*, v. 47, p. 1207-1224, 2003.
- GERKEN, T. A. Biophysical approaches to salivary mucin structure, conformation and dynamics. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, v. 4, p. 261- 270, 1993.
- GILBERT, R. O.; ELIA, G.; BEACH, D. H.; KLAESSIG, S.; SINGH, B. N. Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. *Infection and Immunity*, v. 68, p. 4200-4206, 2000.
- GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D.B.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G.A.; BOGO, M.R.; ZUANAZZI, J.A.; TASCA, T. Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Natural Products*, v. 27, p. 2019-2023, 2010.
- GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D.B.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G.A.; BOGO, M.R.; ZUANAZZI, J.A.; TASCA, T. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry*, v. 72, p. 645-650, 2011.
- GOLDSTEIN, F.; GOLDMAN, M. B.; CRAMER, D. W. Relation of tubal infertility to a story of sexually transmitted diseases. *American Journal of Epidemiology*, v. 137, p. 577-584, 1993.
- GOMEZ, G.; SITKOVSKY, M.V. Differential requirement for A<sub>2A</sub> and A<sub>3</sub> adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. *Blood*, v. 102, p. 4472-4478, 2003.

- GONZALEZ-GRONOW, M.; HERSHFIELD, M. S.; ARREDONDO-VEGA, F. X.; SALVATORE V. PIZZO, S. V. Cell surface adenosine deaminase binds and stimulates plasminogen activation on 1-LN human prostate cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 20993-20998, 2004.
- GORRELL, T.E. Effect of culture medium iron content on the biochemical composition and metabolism of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Bacteriology*, v. 161 p. 1228-1230, 1985.
- GOUNARIS, K. Nucleotidase cascades are catalyzed by secreted proteins of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity*, v. 70, p. 4917-4924, 2002.
- GOUNARIS, K., SELKIRK, M.E. Parasite nucleotidemetabolizing enzymes and host purinergic signalling. *Trends in Parasitology*, v. 21, p. 17-21, 2005.
- HAN, I. H.; GOO, S. Y.; PARK, S. J.; HWANG, S. J.; KIM, Y. S.; YANG, M. S.; AHN, M. H.; RYU, J. S. Proinflammatory Cytokine and Nitric Oxide Production by Human Macrophages Stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *The Korean Journal of Parasitology*, v. 47, p. 205-212, 2009.
- HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 218, p. 916–923, 1996.
- HARRIS, D. I.; BEECHEY, R. B.; LINSTEAD, D.; BARRETT, J. Nucleoside uptake by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 29, p. 105-106, 1988.
- HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*, v. 25, p. 33-39, 2004.

- HASKÓ, G.; SITKOVSKY, M. V.; SZABÓ, C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, v. 25, p. 152-157, 2004.
- HELMS, D. J.; MOSURE, D. J.; SECOR, W. E.; WORKOWSKI, K. A. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 198, p. 370-377, 2008.
- HERNANDEZ, H. SARRIEGO, I.; GARBER, G.; DELGADO, R.; LOPEZ, O.; SARRACENT, J. Monoclonal antibodies against a 62 kDa proteinase of *Trichomonas vaginalis* decrease parasite cytoadherence to epithelial cells and confer protection in mice. *Parasite Immunology*, v. 26, p. 119-125, 2004.
- HERNANDEZ-GUTIERREZ, R.; AVILA-GONZALEZ, L.; ORTEGA-LOPEZ, J.; CRUZ-TALONIA, F.; GOMEZ-GUTIERREZ, G.; ARROYO, R. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39 kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental Parasitology*, v. 107, p. 125-135, 2004.
- HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E.; GINGER, C. D. Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters*, v. 141, p. 106-110, 1982.
- HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E.; GINGER, C. D. Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters*, v. 176, p. 55-60, 1984.
- HONIGBERG, B. M.; BRUGEROLLE, G. Structure. In: HONIGBERG, B. M. (Ed.). *Trichomonads Parasitic in Humans*. New York: Springer, p. 05-35, 1990.
- HONINGBERG, B. M.; KING, V. M. Structure of *Trichomonas vaginalis* Donne. *Journal of Parasitology*, v. 50, p. 345-364, 1964.
- IMAM, N. F.; EASSA, A. H.; SHOEIB, E. Y.; ABO-RAIA, G. Y. Antibody isotypes in urethral swabs of symptomatic and asymptomatic men infected with *Trichomonas vaginalis*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, v. 37, p. 977-988, 2007.

- JUNGER, W. G. Purinergic regulation of neutrophil chemotaxis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, p. 2528-2540, 2008.
- KANG, J. H.; SONG, H. O.; RYU, J. S.; SHIN, M. H.; KIM, J. M.; CHO, Y. S.; ALDERETE, J. F.; AHN, M. H.; MIN, D. Y. *Trichomonas vaginalis* promotes apoptosis of human neutrophils by activating caspase-3 and reducing Mcl-1 expression. *Parasite Immunology*, v. 28, p. 439-446, 2006.
- KATO, H; JOCHIM, R. C.; LAWYER, P. G.; VALENZUELA, J. G. Identification and characterization of a salivary adenosine deaminase from the sand fly *Phlebotomus duboscqi*, the vector of *Leishmania major* in sub-Saharan Africa. *The Journal of Experimental Biology*, v. 210, p. 733-740, 2006.
- KIM, Y.S.; SONG, H.O.; CHOI, I.H.; PARK, S.J.; RYU, J.S. Hydrogenosomal activity of *Trichomonas vaginalis* cultivated under different iron conditions. *Korean Journal of Parasitology*, v. 44, p. 373-378, 2006.
- KLEBANOFF, M. A.; CAREY, J. C.; HAUTH, J. C.; HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; THOM, E. A.; ERNEST, J. M.; HEINE, R. P.; WAPNER, R. J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; MIODOVNIK, M.; SIBAI, B. M.; DORSTEN, J. P. V.; DOMBROWSKI, M. P.; O'SULLIVAN, M. J.; VARNER, M.; LANGER, O.; MCNELLIS, D.; ROBERTS, J. M.; LEVENO, K. J. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *The New England Journal of Medicine*, v. 345, p. 487-493, 2001.
- KNOWLES, A. F. The GDA<sub>1</sub> CD<sub>39</sub> superfamily: NTPDases with diverse functions. *Purinergic Signaling*, v. 7, p. 21-45, 2011.
- KRIEGER, J. N.; REIN, M. F. Canine prostatic secretions kill *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, v. 37, p. 77-81, 1982.



- KUCKNOOR, A. S.; MUNDODI, V.; ALDERETE, J. F. The proteins secreted by *Trichomonas vaginalis* and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65. *Cell Microbiology*, v. 9, p. 2586–2597, 2007.
- KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 199-212, 1999.
- LEE, M. V.; Topper, S. E.; Hubler S. L.; Hose, J.; Wenger, C. D.; Coon, J. J.; Gasch, A. P. A dynamic model of proteome changes reveals new roles for transcript alteration in yeast. *Molecular System Biology*, v. 7, p. 514, 2011.
- LEHKER, M. W.; SWEENEY, D. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sexually Transmitted Infections*, v. 75, p. 231-238, 1999.
- LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Biology of trichomonosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 13, p. 37-45, 2000.
- LEVINE, W. C.; POPE, V.; BHOOMKHAR, A. Increase in endocervical CD4 lymphocytes among women with nonulcerative sexually transmitted diseases. *Journal of Infection Diseases*, v. 177, p. 167-174, 1998.
- LINDEN, J. Molecular approach to adenosine receptors: Receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 41, p. 775-787, 2001.
- LINDQUIST, S.; CRAING, E.A. The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, v. 22, p. 631- 677, 1988.
- MACK, S. R.; MÜLLER, M. End products of carbohydrate metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 67, p. 213-216, 1980.

- MAIER, S. A.; GALELLIS, J. R.; MCDERMID, H. E. Phylogenetic analysis reveals a novel protein family closely related to adenosine deaminase. *Journal of Molecular Evolution*, v. 61, p. 776-794, 2005.
- MANSOUR, T. E. The search for antiparasitic agents. In: MANSOUR, T. E. *Chemotherapeutic targets in parasites. Contemporary Strategies*. 1 ed. New York: Cambridge University Press, p. 1-16, 2002.
- MARTON, A.; PACHER, P.; MURTHY, K. G.; NÉMETH, Z.H.; HASKÓ, G.; SZABÓ, C. Anti-inflammatory effects of inosine in human monocytes, neutrophils and epithelial cells in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 8, p. 617-621, 2001.
- MATOS, J. A. A.; BORGES, F. P.; TASCA, T.; BOGO, M. R.; DE CARLI, G. A.; DA GRAÇA FAUTH, M.; DIAS, R. D.; BONAN, C. D. Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 770-775, 2001.
- MC CLELLAND, R. S.; SANGARÉ, L.; HASSAN, W. M.; LAVREYS, L.; MANDALIYA, K.; KIARIE, J.; NDINYA-ACHOLA, J.; JAOKO, W.; BAETEN, J. M. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *Journal of Infectious Diseases*, v. 195, p. 698-702, 2007.
- MENDOZA-LOPEZ, M.R.; BECERRIL-GARCIA, C.; FATTEL-FACENDA, L.V.; AVILA- GONZALEZ, L.; RUIZ-TACHIQUIN, M.E.; ORTEGA-LOPEZ, J.; ARROYO, R. CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infection and Immunity*, v. 68, p. 4907-4912, 2000.
- MEZA-CERVANTEZ, P.; GONZALEZ-ROBLES, A.; CARDENAS-GUERRA, R. E.; ORTEGA-LOPEZ, J.; SAAVEDRA, E.; PINEDA, E.; ARROYO, R. Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. *Microbiology*, v. 157, p. 3469-3482, 2011.

- MILLER, E. F.; VAISH, S.; MAIER, R.J. Efficiency of purine utilization by *Helicobacter pylori*: roles for adenosine deaminase and a NupC homolog. PLoS One, v. 7, p. e38727, 2012.
- MILLER, M. R.; NYIRJESY, P. Refractory trichomoniasis in HIV-positive and HIV-negative subjects. Current Infectious Disease Reports, v. 13, p. 595-603, 2011.
- MILLER, R. L.; LINDSTEAD, D. Purine and pyrimidine metabolizing activities in *Trichomonas vaginalis* extracts. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 7, p. 41-51, 1983.
- MINOTTO, L.; KO, G. A.; EDWARDS, M. R.; BAGNARA, A. S. *Trichomonas vaginalis*: expression and characterisation of recombinant S-adenosylhomocysteinase. Experimental Parasitology, v. 90, p. 175-180, 1998.
- MOHAMED, T. Adenosine deaminase from camel tick *Hyalomma dromedarii*: purification and characterization. Experimental and Applied Acarology, v. 40, p. 101-111, 2006.
- MOODLEY, P.; WILKINSON, D.; CONNOLLY, C.; MOODLEY, J.; STURM, A.W. *Trichomonas vaginalis* is associated with pelvic inflammatory disease in women infected with human immunodeficiency virus. Clinical Infectious Diseases, v. 34, p. 519-522, 2002.
- MORADA, M.; SMID, O.; HAMPL, V.; SUTAK, R.; LAM, B.; RAPPELLI, P.; DESSI, D.; FIORI, P. L.; JAN TACHEZY, J.; YARLETT, N. Hydrogenosome-localization of arginine deiminase in *Trichomonas vaginalis*. Molecular & Biochemical Parasitology, v. 176, p. 51-54, 2011.
- MORENO-BRITO, V.; YÁÑEZ-GÓMEZ, C.; MEZA-CERVANTEZ, P.; ÁVILA-GONZÁLEZ, L.; RODRÍGUEZ, M. A.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; ARROYO, R. A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. Cellular Microbiology, v. 7, p. 245-258, 2005.

- MÜLLER, M. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annual Review of Microbiology*, v. 42, p. 465–488, 1988.
- MÜLLER, M. The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology*, v. 139, p. 2879–2889, 1993.
- MUNAGALA, N. R.; WANG, C. C. Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 127, p. 143-149, 2003.
- PEREIRA-NEVES, A.; BENCHIMOL, M. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biology of the Cell*, v. 99, p. 87-101, 2007.
- PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, p. 300-317, 1998.
- PINK, R.; HUDSON, A. T.; MOURIES, M.-A.; BENDIG, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 727-740, 2005.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, v. 50, p. 413–492, 1998.
- RIBEIRO, J.M.C.; CHARLAB, R.; VALENZUELA, J.G. The salivary adenosine desaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. *Journal of Experimental Biology*, v. 204, p. 2001-2010, 2001.
- ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling*, v. 2, p.409-430, 2006.

- ROSEMBERG, D. B.; RICO, E. P.; GUIDOTI, M. R.; RENATO DUTRA DIAS, R. D.; DIOGO ONOFRE SOUZA, D. O.; CARLA DENISE BONAN, C. D.; MAURÍCIO REIS BOGO. M. R. Adenosine deaminase-related genes: Molecular identification, tissue expression pattern and truncated alternative splice isoform in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sciences*, v. 81, p. 1526–1534, 2007.
- RÜCKERT, C.; STUEPP, C. S.; GOTTARDI, B.; ROSA, J.; CISILOTTO, J.; BORGES, F. P.; BOGO, M. R.; TASCA, T.; DE CARLI, G. A.; BONAN, C. D. Steroid hormones alter AMP hydrolysis in intact trophozoites of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*, v. 105, p. 1701-1706, 2009.
- RÜCKERT, C.; STUEPP, C. S.; GOTTARDI, B.; ROSA, J.; CISILOTTO, J.; BORGES, F. P.; ROSEMBERG, D. B.; BOGO, M. R.; TASCA, T.; DE CARLI, G. A.; BONAN, C. D. *Trichomonas vaginalis*: dehydroepiandrosterone sulfate and 17beta-estradiol alter NTPDase activity and gene expression. *Experimental Parasitology*, v. 125, p.187-195, 2010.
- RYU, J. S.; KANG, J. H.; JUNG, S. Y.; SHIN, M. H.; KIM, J. M.; PARK, H., MIN, D. Y. Production of interleukin-8 by human neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, v. 72, p. 1326-1332, 2004.
- RYU, J.S.; CHOI, H.K.; MIN, D.Y.; HA, S.E.; AHN, M.H. Effect of iron on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Parasitology*, v. 87, p. 457-460, 2001.
- SANSOM, F. M.; ROBSON, S. C.; HARTLAND, E. L. Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.72, p. 765–781, 2008.
- SCHWEBKE, J.R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, p. 794–803, 2004.
- SEÑA, A. C.; MILLER, W.C.; HOBBS, M. M.; SCHWEBKE, J. R.; LEONE, P. A.; SWYGARD, H.; ATASHILI, J.; COHEN, M. S. *Trichomonas vaginalis* infection in

- male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical Infectious Diseases*, v. 44, p. 13-22, 2007.
- SHAIO, M. F.; LIN, P. R.; LIU, J. Y.; YANG, K.D. Generation of interleukin-8 from human monocytes in response to *Trichomonas vaginalis* stimulation. *Infection and Immunity*, v. 63, p. 3864–3870, 1995.
- SILVA, A. S.; PIMENTEL, V. C.; JAQUES, J. A. S.; WOLKMER, P.; TAVARES, K. C. S.; LAZZAROTTO C. R.; MILETTI, L. C.; SCHETINGER, M. R. C.; MAZZANTI, C. M.; LOPES, S. T.A.; MONTEIRO, S. G. Biochemical detection of adenosine deaminase in *Trypanosoma evansi*. *Experimental Parasitology*, v. 128, p. 298–300, 2011.
- SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and africans-americans. *Emerging Infectious Disease*, v. 7, p. 927-932, 2001.
- STEINBÜCHEL, A.; MÜLLER, M. Glycerol, a metabolic end product of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 20, p. 45-55, 1986.
- SUTCLIFFE, S. Sexually transmitted infections and risk of prostate cancer: review of historical and emerging hypotheses. *Future Oncology*, v 6, p. 1289-311, 2010.
- TASCA, T.; BONAN, C. D.; DE CARLI, G. A.; BATTASTINI, A. M.;SARKIS, J. J. Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (E.C 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Parasitology*, v. 105, p. 167-173, 2003.
- TASCA, T.; BONAN, C. D.; DE CARLI, G. A.; SARKIS, J. J. *Trichomonas vaginalis*: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability. *Parasitology Research*, v. 93, p. 300-303, 2004.

- TASCA, T.; BONAN, C. D.; DE CARLI, G. A.; SARKIS, J. J.; ALDERETE, J. F. Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*, v. 131, p. 71-78, 2005.
- TORRES-ROMERO, J. C.; ARROYO, R. Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, p. 1065-1074, 2009.
- UNGERER, J. P.; OOSTHUIZEN, H.M.; BISSBORT, S.H.; VERMAAK, W.J. Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. *Clinical Chemistry*, v. 38, p. 1322-1326, 1992.
- VALE, M.R.; PEREIRA, R. V.; ALMEIDA, Y. M.; NUNES, S. F. L.C. Characterization of adenosine deaminase (ADA) in hemolymph of *Biomphalaria glabrata*. *Brazilian Journal of Biology*, v. 6, p. 271-280, 2005
- VAN DER POL, B. *Trichomonas vaginalis* infection: The most prevalent nonviral sexually transmitted infection receives the least public health attention. *Clinical Infectious Diseases*, v. 44, p. 23-25, 2007.
- VARGAS-VILLARREAL, J.; MATA-CÁRDENAS, B. D.; GONZÁLEZ-SALAZAR, F.; LOZANO-GARZA, H.G.; CORTES-GUTIERREZ, E. I.; PALACLOS-CORONA, R.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, H. G.; RAMÍREZ-BOM, E.; SAID-FERNÁNDEZ, S. *Trichomonas vaginalis*: identification of a phospholipase A-dependent hemolytic activity in a vesicular subcellular fraction. *Journal of Parasitology*, v, 89, p. 105-112, 2003.
- VIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncologica*, v. 39, p. 71-75, 2000.
- VOGEL, C.; MARCOTTE, E. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, v. 13, p. 227-232, 2012.

- VOGEL, C.; SILVA, G. M.; MARCOTTE, E. M. Protein expression regulation under oxidative stress. *Molecular & Cellular Proteomics*, doi:10.1074/mcp.M111.009217, 2011.
- WANG, C. C. Validating targets for antiparasite chemotherapy. *Parasitology*, v. 114, p. S31 - S44, 1997.
- WANG, C.C.; CHENG, H.W. Salvage of pyrimidine nucleosides by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 10, p. 171-184, 1984.
- WEIZENMANN, M.; FRASSON, A. P.; BARROS, M. P.; VIEIRA, P. B.; ROSEMBERG, D. B.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D.; TASCA, T. Kinetic characterization and gene expression of adenosine deaminase in intact trophozoites of *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 319, p. 115-124, 2011.
- WILSON, D.K.; RUDOLPH, F.B.; QUIOCHO, F.A. Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science*, v. 252, p. 1278-1284, 1991.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections - 2008. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, Geneva, 2012.
- YADAV, M.; GUPTA, I.; MALLA, N. Kinetics of immunoglobulin G, M, A and IgG subclass responses in experimental intravaginal trichomoniasis: prominence of IgG1 response. *Parasite Immunology*, v. 27, p. 461-467, 2005.
- YAMAMOTO, T.; GEIGER, J. D.; DADDONA, P. E.; NAGY J. I. Subcellular, regional and immunohistochemical localization of adenosine deaminase in various species. *Brain Research Bulletin*, v. 19, p. 473-484, 1987



YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1783, p. 673-694, 2008.

ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase - molecular structure and functional aspects. *Biochemical Journal*, v. 285, p. 345–365, 1992.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, v. 362, p. 299–309, 2000.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research*, v. 52, p. 44-56, 2001.




## **VIII. Anexos**

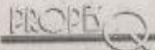
---



## VIII.1 Carta de aprovação do Comitê de Ética da UFRGS

 **UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs



**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs analisou o projeto:

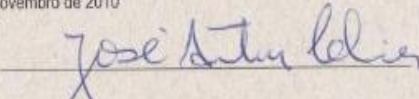
**Número:** 18923  
**Título:** Diagnóstico laboratorial de tricomonose e candidíase em serviços de saúde pública em Porto Alegre, RS: prevalência e perfil de sensibilidade a fármacos

**Pesquisadores:**  
**Equipe UFRGS:**

TIANA TASCA - coordenador desde 15/05/2010  
ALEXANDRE MENEGHELLO FUENTEFRIA - pesquisador desde 15/05/2010  
MARIANA DICKI FREITAS - Aluno de Graduação desde 15/05/2010

*Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs aprovou o mesmo, em reunião realizada em 11/11/2010 - Sala de Reuniões do Gabinete do Reitor (Ex Salão Vermelho) - Prédio Reitoria, 6º andar, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.*

Porto Alegre, Quinta-Feira, 11 de Novembro de 2010



JOSE ARTUR BOGO CHIES  
Coordenador da comissão de ética



### VIII.1 Artigos publicados no período de vigência do mestrado

1. WEIZENMANN, M.; BARROS, M. P.; FRASSON, A. P.; VIEIRA, P. B.; ROSEMBERG, D.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M.; BONAN, C. D.; TASCA, T. Kinetic characterization and gene expression of adenosine deaminase in intact trophozoites of *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 319, p. 115-124, 2011.
2. MURIEL PRIMON DE BARROS; ADRINE MARIA INNOCENTE; GLORIA NARJARA SANTOS DA SILVA; MARIANA DUARTE; SITA LUVANGADIO LUKOKI VUNDA; TIANA TASCA. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários intracelulares: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* spp. *Revista Liberato*, v. 13, p. 07-25, 2012.
3. ZIMMER, K.R.; SEIXAS, A.; CONCEIÇÃO, J.M.; ZVOBODA, D.A.; BARROS, M.P.; TASCA, T.; MACEDO, A.J.; TERMIGNONI C. Cattle tick-associated bacteria possess anti-biofilm and anti-*Tritrichomonas foetus* activity. *Veterinary Microbiology* (Aceito para publicação).