

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

Sistema purinérgico de *Trichomonas vaginalis*: envolvimento da ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase e da ecto-5'-nucleotidase na produção de adenosina e na secreção de óxido nítrico por neutrófilos

AMANDA PICCOLI FRASSON

PORTO ALEGRE, 2011



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

Sistema purinérgico de *Trichomonas vaginalis*: envolvimento da ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase e da ecto-5'-nucleotidase na produção de adenosina e na secreção de óxido nítrico por neutrófilos

Dissertação apresentada por  
**Amanda Piccoli Frasson** para obtenção do GRAU  
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr. Tiana Tasca

Porto Alegre, 2011

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31/03/2011 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Ana M. O. Battastini

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Andréia Buffon

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Marilise B. Rott

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

F843s Frasson, Amanda Piccoli

Sistema purinérgico de trichomonas vaginalis: envolvimento da ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase e da ecto-5'-nucleotidase na produção de adenosina e na secreção de óxido nítrico por neutrófilos / Amanda Piccoli Frasson – Porto Alegre: UFRGS, 2011. – xvi, 140 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Trichomonas vaginalis. 2. Ectonucleotidases. 3. Adenosina. 4. Óxido nítrico. 6. Bioquímica. 7. Parasitologia. I. Tasca, Tiana. II. Título.

CDU: 616-074.41:577.1

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Este trabalho 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 do CNPq.



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, instituição responsável pela minha formação acadêmica e da qual muito me orgulho em fazer parte, pelo suporte científico e pelo incentivo e valorização constantes à pesquisa.

À Faculdade de Farmácia e seus professores, pelas pessoas queridas que tive a oportunidade de conhecer, pelas amizades que construí e por todos os ensinamentos que me foram transmitidos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr. Tiana Tasca, pela acolhida no seu grupo de pesquisa e pela amizade incondicional construída nesse período. Agradeço aos exemplos de ética, profissionalismo, dedicação à pesquisa e humanidade. Obrigada pela convivência diária, pelos conselhos, ensinamentos, pelas horas dispendidas e por ser uma grande responsável pela minha formação profissional e também, pessoal. Muito obrigada por acreditar e confiar em mim.

Aos meus queridos colegas e amigos do Laboratório de Pesquisa em Parasitologia - Patrícia, Marina, Mariana, Raquel, Clara, Franqueline, Dejoara, Muriel, Nicolas, Grazi, Débora e Júlia. Agradeço pela troca de conhecimentos, pelo convívio e pela amizade construída. Obrigada pelas contribuições e participação no desenvolvimento desta dissertação. Muito obrigada pelos momentos de descontração e por tornar o nosso ambiente de trabalho tão agradável; certamente a companhia de vocês torna a pesquisa muito mais fácil. Um agradecimento especial à Patrícia, Marina, Mariana e Raquel pela paciência e pelos ensinamentos quando iniciei no Laboratório.

Aos demais colegas da Faculdade de Farmácia, especialmente aos colegas de Mestrado, e ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Alexandre Macedo, pelo apoio, pelas oportunidades e pela convivência.

A todos os colaboradores que participaram desta Dissertação, pelo auxílio e parceria.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado cedida. Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr. Marilise Brittes Rott, por me acolher e me apresentar o universo da Parasitologia. Obrigada pelos exemplos de profissional e de ser humano. À Ana Maris Carlesso e à Karin Caumo, pelos conhecimentos e pelas primeiras experiências científicas.

Às minhas queridas amigas da Graduação que me acompanharam nesta fase do Mestrado, Amanda Barden, Maiara Pigatto e Thatiana Terroso, muito obrigada pelas longas conversas, pelo companheirismo, pelos bons e divertidos momentos juntas.

Às amizades construídas na época da Graduação e que perduram até hoje, por estarem junto de mim, pelo conforto e pelas alegrias proporcionadas.

Às fortes, duradouras e verdadeiras amizades construídas em Caxias, pelo companheirismo e incentivo permanentes.

Ao meu namorado Bruno, pela paciência e pela compreensão. Obrigada pelo incentivo, pelo apoio, pelo carinho, pelas conversas e pelo companheirismo em todos os momentos.

À minha avó Edilia e aos demais familiares, pela força e pelos alegres momentos.

À minha irmã Luana, pela companhia, pela atenção, pelo conforto e incentivo.

Aos meus pais, Clovis e Jocelia, pelo suporte, pela infinita dedicação e pelo amor. Obrigada por acreditarem que a educação é o maior legado e assim, não medirem esforços para me proporcioná-la. Agradeço a todos os valores transmitidos e ao incentivo sempre oferecido.



*“Maravilhar-se é o primeiro passo para um descobrimento”*

Louis Pasteur



## RESUMO

*Trichomonas vaginalis* é um protozoário flagelado parasita do trato urogenital humano, agente etiológico da tricomonose - a DST não viral mais frequente no mundo. No processo inflamatório promovido pela infecção, a infiltração leucocitária é principal mudança citológica observada. Considerando o impacto da doença na saúde pública e a importância em investigar novos alvos terapêuticos para o tratamento da tricomonose, o estudo de aspectos bioquímicos do parasito torna-se fundamental. Nucleotídeos extracelulares, especialmente ATP, são liberados pelas células em situações de estresse, anóxia ou lesão, sequencialmente, as ectonucleotidases são capazes de hidrolizá-los, levando à produção de adenosina. De forma importante, *T. vaginalis* não realiza síntese *de novo* de purinas e as enzimas participam das vias de salvação. Avaliando-se o perfil das ectonucleotidases de *T. vaginalis* em uma condição de limitação de soro bovino, o qual representa a fonte de adenosina aos trofozoítos, observou-se um aumento significativo da hidrólise de ATP, ADP e AMP, assim como da expressão gênica da NTPDase e do metabolismo dos nucleotídeos extracelulares. Além disso, essa situação promoveu atraso do ciclo celular dos parasitos nos estágios G0/G1, sugerindo um aumento do *pool* intracelular de nucleotídeos da adenina. Na tentativa de melhor compreender os mecanismos envolvidos no recrutamento de leucócitos para o sítio da infecção, investigou-se a produção de óxido nítrico (NO) por neutrófilos estimulados com *T. vaginalis*. Os trofozoítos promoveram aumento dos níveis de NO, o qual, provavelmente, é sintetizado pela forma induzível da enzima óxido nítrico sintase. Os nucleotídeos da adenina não foram capazes de modular a produção de NO, diferentemente da adenosina, que provocou significativa redução da secreção do mediador, provavelmente através da ativação de receptores A<sub>2A</sub>. Os resultados obtidos nesta dissertação demonstram a importância das ectonucleotidases de *T. vaginalis* na geração de adenosina, e contribuem para o entendimento de mecanismos envolvidos com a imunidade na tricomonose.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*, NTPDase, ecto-5'-nucleotidase, adenosina, limitação de soro, óxido nítrico.



## ABSTRACT

*Trichomonas vaginalis* purinergic system: involvement of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase on adenosine production and oxide nitric release by neutrophils

*Trichomonas vaginalis* is a flagellated protozoan parasite of human urogenital tract that causes trichomonosis - the most common non-viral STD in the world. In the inflammatory process promoted by infection, the leukocytic infiltration is the main cytological change observed. Considering the disease impact on public health and the search for new therapeutic targets to trichomonosis treatment, it is important to investigate the biochemical aspects of the parasite. Extracellular nucleotides, especially ATP, are released by cells under stress, anoxia or injury and they can be degraded to adenosine by ectonucleotidases. Importantly, *T. vaginalis* lacks the ability to synthesize purines *de novo*, and the enzymes act on the salvage pathways generating the nucleosides. Evaluating the profile of *T. vaginalis* ectonucleotidases in a serum limitation condition, a significant increase in ATP, ADP and AMP hydrolysis was observed. NTPDase gene expression and the metabolism of extracellular nucleotides were also increased. Moreover, the serum limitation promoted cell cycle arrest at G0/G1 phases, suggesting an increase in intracellular pool of adenine nucleotides. To better understand the mechanisms involved in leukocyte recruitment to infection site, the nitric oxide (NO) production by neutrophils stimulated with *T. vaginalis* was investigated. The trophozoites caused increase in NO synthesis, which is probably performed by nitric oxide synthase. The adenine nucleotides were not able to modulate the NO production. In contrast, the adenosine promoted a significant reduction in the compound levels, likely through of A<sub>2A</sub> receptors activation. The results obtained in this study evidence the importance of *T. vaginalis* ectonucleotidases on adenosine generation and contribute to the host-parasite interactions as well as the immunity in trichomonosis.

**Keywords:** *Trichomonas vaginalis*, NTPDase, ecto-5'-nucleotidase, adenosine, serum limitation, nitric oxide.



## SUMÁRIO

### PARTE I

<b>I. Introdução.....</b>	<b>3</b>
I.1. <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	5
I.2. Tricomonose.....	8
I.2.1. Mecanismos de Patogenicidade.....	10
I.2.2. Imunidade.....	12
I.2.2.1. Resposta Imune Inata.....	13
I.2.2.2. Resposta Imune Adaptativa.....	15
I.3. Sistema Purinérgico.....	16
I.3.1. Nucleotídeos e Nucleosídeos Extracelulares e Purinoceptores.....	16
I.3.2. ATP e Adenosina: Papel na Inflamação.....	18
I.3.3. Ectonucleotidases.....	19
I.3.3.1. Ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (E-NTPDase, EC 3.6.1.5)	21
I.3.3.2. Ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5).....	22
I.3.4. Adenosina deaminase (ADA, EC 3.5.4.4).....	23
I.3.5. Ectonucleotidases e adenosina deaminase em <i>T. vaginalis</i> .....	23
<b>I.4. Objetivos.....</b>	<b>27</b>

### PARTE II

<b>II. Artigos Científicos.....</b>	<b>33</b>
II.1. CAPÍTULO 1 - <u>Amanda Piccoli Frasson</u> , Mariele Feiffer Charão, Denis Broock Rosemberg, Ana Paula de Souza, Solange Cristina Garcia, Cristina Bonorino, Maurício Reis Bogo, Geraldo Attilio De Carli, Tiana Tasca. Analysis of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase profile in serum-deprived <i>Trichomonas vaginalis</i> . <b>Parasitology</b> (submetido).....	35

II.2. CAPÍTULO 2 – <u>Amanda Piccoli Frasson</u> , Geraldo Attilio De Carli, Carla Denise Bonan, Tiana Tasca. Involvement of purinergic signaling on nitric oxide production by neutrophils stimulated with <i>Trichomonas vaginalis</i> . <b>Purinergic Signalling</b> (submetido).....	67
--	----

### **PARTE III**

<b>III.1. Discussão Geral</b> .....	95
<b>III.2. Conclusões Gerais</b> .....	109
<b>III.3. Perspectivas</b> .....	113
<b>III.4. Referências</b> .....	117
<b>III.5. Anexos</b> .....	135
III.5.1. Carta de Aprovação do Comitê de Ética da UFRGS.....	137
III.5.2. Licenças para Uso das Figuras.....	138



# **PARTE I**



---

---

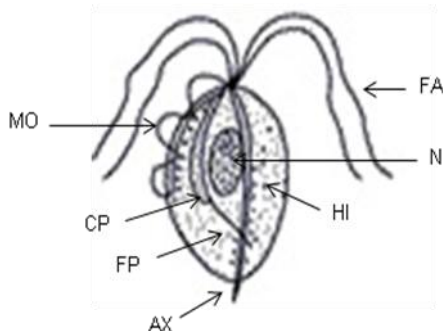
## I. Introdução



## I.1. *Trichomonas vaginalis*

*Trichomonas vaginalis* é um protozoário membro da família Trichomonadidae, da ordem Trichomonadida, da classe Parabasalia e do filo Zoomastigina (SCHEWEBKE e BURGESS, 2004). Entre os tricomonadídeos, a espécie *T. vaginalis* trata-se da mais amplamente estudada, fato justificado pela capacidade do protozoário parasitar o trato genitourinário humano e causar infecção – a tricomonose.

Morfologicamente, *T. vaginalis* é uma célula com tamanhos e formas variados que apresenta em média, 10 µm de comprimento e 7,0 µm de largura (HONIGBERG e BRUGEROLLE, 1990). Como todos os tricomonadídeos, não possui estágio cístico, somente trofozoítico (Figura 1). Em culturas axênicas o protozoário tende a ser mais uniforme, adquirindo formas elipsoides ou ovais, diferentemente do que ocorre quando o parasito encontra-se em contato com células epiteliais vaginais (CEVs), onde assume uma aparência ameboide (ARROYO *et al.*, 1993). O trofozoíto possui cinco flagelos, sendo quatro localizados na região anterior, enquanto o quinto é incorporado à membrana ondulante do parasito. Os flagelos e a membrana ondulante são as estruturas responsáveis pela motilidade característica da célula. O núcleo encontra-se 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 a partir da pelta através do centro do organismo, prolongando-se até a extremidade posterior (HONIGBERG e BRUGEROLLE, 1990; PETRIN *et al.*, 1998). O complexo pelta-axóstilo pode desempenhar duas importantes funções: (i) promover a sustentação do trofozoíto e, (ii) participar do processo de divisão celular realizando a constrição do núcleo durante a cariocinese (BENCHIMOL, 2004). Interessantemente, os tricomonadídeos não possuem mitocôndria nem peroxissomos, mas apresentam uma importante e incomum organela, o hidrogenossomo. Os hidrogenossomos são grânulos densos com alta atividade enzimática que participam do metabolismo do piruvato formado durante a glicólise. Além disso, estas estruturas são o sítio de formação do hidrogênio molecular, cujo processo é acompanhado pela síntese de ATP (MÜLLER, 1993; BENCHIMOL, 2009).

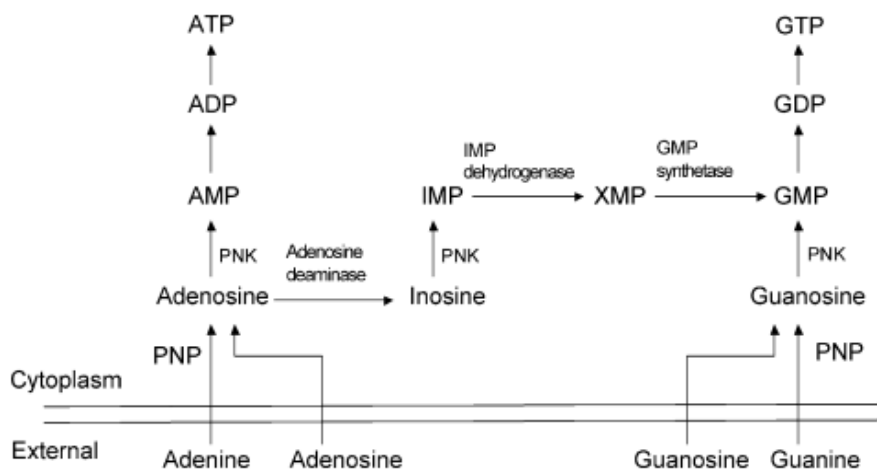


**Figura 1.** Aspectos morfológicos de *Trichomonas vaginalis*. AX (axóstilo), CP (corpo parabasal), FA (flagelo anterior livre), FP (filamento parabasal), HI (hidrogenossomo), MO (membrana ondulante), N (núcleo). Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Trichomoniasis.htm>

O metabolismo de carboidratos no *T. vaginalis* é fermentativo, tanto sob condição anaeróbica quanto aeróbica (MACK e MÜLLER, 1980), sendo as reações energéticas desempenhadas no citoplasma e nos hidrogenossomos (LINDMARK *et al.*, 1975). Os produtos desse metabolismo incluem acetato, lactato, glicerol, CO<sub>2</sub>, e em condições anaeróbicas, H<sub>2</sub> (MACK e MÜLLER, 1980; LINDMARK *et al.*, 1989). Os carboidratos são as fontes nutricionais preferidas pelos trofozoítos, entretanto, na limitação destes, os aminoácidos desempenham papel importante na manutenção do crescimento dos parasitos (PETRIN *et al.*, 1998). Quanto ao metabolismo lipídico, *T. vaginalis* contém colesterol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e esfingomiéline como principais moléculas fosfolipídicas, no entanto, os trofozoítos são incapazes de sintetizar ácidos graxos e esteróis, dependendo assim, de fontes exógenas de lipídios (BEACH *et al.*, 1990; 1991).

*T. vaginalis* é incapaz de realizar síntese *de novo* de nucleotídeos púricos e pirimídicos, dependendo das vias de salvação (Figura 2) (HEYWORTH *et al.*, 1982; 1984). O sistema de salvação de purinas no parasito é altamente simplificado e distinto de outros protozoários. Ele consiste em uma rota de duas enzimas: a purina nucleosídeo fosforilase (PNP, do inglês *Purine Nucleoside Phosphorylase*), a qual catalisa a interconversão entre bases e nucleosídeos púricos, e a purina nucleosídeo quinase (PNK, do inglês *Purine Nucleoside Kinase*), a qual é capaz de converter

nucleosídeos em nucleotídeos. O parasito não incorpora hipoxantina ou inosina nos nucleotídeos e não apresenta atividade de purina fosforibosiltransferase (PRTase, do inglês *Purine Phosphoribosyltransferase*). Além disso, a adenosina é considerada o precursor de todos os nucleotídeos púricos em *T. vaginalis*, sendo capaz de converter adenina à GMP (MUNAGALA e WANG, 2003). Dessa maneira, a incorporação de adenina e guanina exógena é baseada na atividade sequencial das duas enzimas acima mencionadas, ou ainda no caso de disponibilidade externa de adenosina e guanosina, na atividade da PNP somente (HEYWORTH e GUTTERIDGE, 1978; HEYWORTH *et al.*, 1982; MILLER e LINDSTEAD, 1983). A via de salvação de pirimidinas é eficiente para uracila, uridina, citidina e timidina (HEYWORTH *et al.*, 1984). O transporte dos nucleosídeos e nucleotídeos para o interior dos trofozoítos é eficientemente realizado através de dois carreadores. O primeiro apresenta um sítio para nucleosídeos pirimídicos 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, guanosina (HARRIS *et al.*, 1988).



**Figura 2.** Esquema das vias de salvação de purinas em *T. vaginalis*. Adaptado de Munagala e Wang, 2003.

Considerando que o *T. vaginalis* é um parasito obrigatório e incapaz de sintetizar *de novo* diversas macromoléculas, tais como purinas, pirimidinas e lipídios, a obtenção

destes nutrientes é realizada a partir das secreções vaginais ou através da fagocitose de células bacterianas ou do hospedeiro (HUGGINS e PETRI, 1981; PEREIRA-NEVES e BENCHIMOL, 2007). Dessa maneira, o meio de cultivo dos trofozoítos requer a presença de macromoléculas essenciais, vitaminas e minerais, além de soro, outra importante fonte nutricional para o crescimento dos tricomonádídeos (LINSTEAD, 1990).

## I.2. Tricomonose

*T. vaginalis* é o agente etiológico da tricomonose, a doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais frequente no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima cerca de 174 milhões de novos casos da doença a cada ano, prevalência esta superior àquelas relacionadas a infecções por *Chlamydia trachomatis* (92 milhões) e *Neisseria gonorrhoeae* (62 milhões) (WHO, 2001).

Em mulheres, a infecção por *T. vaginalis* apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas. Cerca de um terço das pacientes infectadas são assintomáticas, no entanto, a maioria desenvolve sintomatologia acompanhada de comorbidades, como: vaginite, endometrite, adnexite, piossalpinge e associação positiva com vaginose bacteriana (FICHOROVA, 2009; PETRIN *et al.*, 1998). Os sinais inflamatórios da tricomonose incluem corrimento vaginal devido à infiltração leucocitária; irritação e prurido vulvar; pequenos pontos hemorrágicos na mucosa vaginal ou cervical acompanhados de edema e eritema, o que confere uma aparência conhecida como *colpitis macularis* ou “aspecto de morango”; dor abdominal inferior e disúria (PETRIN *et al.*, 1998; SCHWEBKE e BURGESS, 2004).

A prevalência e o panorama da doença no sexo masculino são bem menos caracterizados. A tricomonose é amplamente assintomática em homens, o que os torna carreadores do parasito. Entretanto, a infecção é uma reconhecida causa de uretrite, representando 11% das uretrites não gonocócicas, além de estar associada a complicações como: prostatite, epididimite e infertilidade (KRIEGER *et al.*, 1993).



Ao contrário do que se observa em muitos casos, nos quais a infecção é facilmente tratada, a tricomonose pode causar sérias consequências à saúde, como complicações na gravidez (KLEBANOFF *et al.*, 2001), infertilidade (GOLDSTEIN *et al.*, 1993), predisposição ao câncer cervical (VIAKKI *et al.*, 2000), doença inflamatória pélvica (CHERPES *et al.*, 2006), parto prematuro e baixo peso de recém-nascidos (COTCH *et al.*, 1991; 1997). Além disso, a doença também atua como um cofator para transmissão e aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SORVILLO *et al.*, 2001; VAN DER POL *et al.*, 2008). Os mecanismos dessa associação ainda não estão completamente elucidados, mas estudos apontam o comprometimento da mucosa pelo parasito e a resposta inflamatória na região genital com recrutamento de células alvo para o HIV, como principais fatores responsáveis pela relação *T. vaginalis*-HIV. Esses achados demonstram que medidas eficazes de diagnóstico e tratamento da tricomonose podem reduzir significativamente a transmissão do vírus (LEHKER e ALDERETE, 2000; JOHNSTON e MABEY, 2008).

O tratamento clássico da infecção envolve o uso de fármacos do grupo dos 5-nitroimidazóis, dentre os quais, metronidazol e tinidazol são os únicos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*, USA) e o primeiro representa o fármaco de escolha na terapia (HELMS *et al.*, 2008). O metronidazol penetra na célula através de difusão e é então ativado nos hidrogenossomos; o grupamento nitro é reduzido anaerobicamente pela enzima piruvato-ferredoxina óxido redutase e os radicais nitro formados são citotóxicos, levando à quebra das fitas de DNA e conseqüentemente à morte dos trofozoítos (LLOYD e KRISTENSEN, 1985; MORENO e DOCAMPO, 1985). Entretanto, efeitos adversos estão frequentemente associados ao uso do fármaco, com náusea e tontura atingindo até 12% dos pacientes (CROWELL *et al.*, 2003). Além disso, o metronidazol pode causar, mesmo que com baixo risco, efeitos carcinogênicos e teratogênicos devido a sua capacidade de atravessar a barreira placentária (ROSA *et al.*, 1987; BEARD *et al.*, 1979). De forma importante, a resistência dos isolados frente ao fármaco é uma causa de falha terapêutica (MÜLLER *et al.*, 1988) e está relacionada a uma diminuição ou ausência da atividade e expressão

das enzimas piruvato-ferredoxina óxido redutase e hidrogenase (KULDA, 1999). Neste contexto, considerando que as opções de tratamento para tricomonose são bastante limitadas, a investigação de aspectos bioquímicos do parasito é fundamental para o desenvolvimento de novos fármacos, busca de novos alvos e de moléculas com atividade específica contra *T. vaginalis*.

### I.2.1. Mecanismos de Patogenicidade

Diversos mecanismos patogênicos do *T. vaginalis* contribuem para o estabelecimento da infecção, entre eles os mecanismos independentes do contato parasito-hospedeiro, e os mecanismos dependentes desse contato, os quais parecem ter papel mais importante na virulência.

Uma característica bem definida e chave na colonização e infecção por *T. vaginalis* é a citoaderência (ALDERETE *et al.*, 1995). Cinco moléculas antigênicas da superfície de *T. vaginalis* denominadas adesinas, AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23, foram encontradas envolvidas na aderência do parasito às CEVs (GARCIA *et al.*, 2003; KUCKNOOR *et al.*, 2007). As adesinas são expressas por uma família multigene, indicando a importância na geração de um elevado número de moléculas protéicas bem como na diversidade funcional dessas proteínas, visto que estas i) atuam como adesinas durante a interação com as células epiteliais; ii) apresentam atividade metabólica, pois apresentam grande homologia com as enzimas hidrogenossomais piruvato-ferredoxina óxido redutase (PFOR), enzima málica e subunidades  $\alpha$ - e  $\beta$ -succinil-CoA sintetase; iii) podem mediar a ligação à hemoglobina para a aquisição de ferro, e iv) são consideradas moléculas mimetizadoras (ALDERETE *et al.*, 2001), pois possuem grande identidade com enzimas do hospedeiro, com exceção da AP120 (ALDERETE *et al.*, 1995; ENGBRING e ALDERETE, 1998; MORENO-BRITO *et al.*, 2005). Garcia e Alderete (2007) demonstraram que a AP65 e possivelmente as outras adesinas, podem ser secretadas antes da adesão do parasito. Conforme o modelo proposto, a AP65 é secretada no meio extracelular e liga-se como um monômero ou

dímero a um sítio específico na superfície do parasito. O ferro é considerado um fator regulador da virulência, visto que o aumento do número de transcritos e a colocalização das adesinas na superfície celular, fora dos hidrogenossomos, seu local de origem, ocorre somente em *T. vaginalis* submetido a crescimento em meio enriquecido por ferro (LEHKER *et al.*, 1991; GARCIA *et al.*, 2003). Após breve contato de *T. vaginalis* com as CEVs, os trofozoítos aumentam a síntese de adesinas e alteram sua morfologia passando de uma forma elipsoide para ameboide. Quando o parasito se encontra em um meio com baixa concentração de ferro torna-se incapaz de sintetizar novas adesinas. Dessa maneira, lança mão de seu formato ameboide para máxima interação com as CEVs e utiliza as adesinas existentes para uma ótima fixação às mesmas (KUCKNOOR *et al.*, 2005).

A hemólise e a secreção de proteases representam outros importantes mecanismos patogênicos dependentes de contato. A lise dos eritrócitos é uma via de aquisição de nutrientes como lipídios e, principalmente ferro, que ocorre após interação entre trofozoítos e eritrócitos (FIORI *et al.*, 1993). Da mesma maneira, as cisteína proteases têm sido consideradas prováveis fatores líticos envolvidos na hemólise e a atividade dessas enzimas está relacionada à aderência dos parasitos às CEVs (ARROYO e ALDERETE, 1989).

Mecanismos independentes de contato também desempenham funções na patogênese do *T. vaginalis*. CDF (do inglês, *Cell-Detaching Factor*) é uma glicoproteína produzida pelo protozoário que apresenta efeitos citopáticos sobre culturas celulares. Além disso, os níveis de CDF correlacionam-se com a severidade dos sintomas clínicos de vaginite, o que demonstra a importância desse composto na infecção *in vivo* (GARBER e BOWIE, 1989; GARBER e LEMCHUK-FAVEL, 1990). A interação do parasito com a flora vaginal normal também deve ser considerada no estabelecimento da tricomonose, pois a elevação do pH promovida pelo *T. vaginalis* é acompanhada da redução dos *Lactobacillus acidophilus* e do aumento de bactérias anaeróbicas (MC GRORY *et al.*, 1994).

A habilidade de evadir o sistema imune é outro aspecto importante na patogenicidade (PETRIN *et al.*, 1998). O sistema complemento, durante o período menstrual, é bastante citotóxico levando à redução do número de protozoários. Entretanto, a infecção persiste mesmo sob essa condição adversa, devido à capacidade das cisteína proteases degradarem a porção C3 do complemento na superfície do microrganismo (ALDERETE *et al.*, 1995). Como outros protozoários, *T. vaginalis* também pode apresentar variações fenotípicas como escape à resposta imune do hospedeiro. Por exemplo, a alternância da expressão de glicoproteínas de superfície altamente imunogênicas, como P270, e de adesinas, as quais mimetizam a estrutura da enzima málica, permite a sobrevivência do parasito evitando a produção de anticorpos (LÓPEZ *et al.*, 2000). Ao mesmo tempo, *T. vaginalis* é capaz de revestir a sua superfície celular com proteínas plasmáticas do próprio hospedeiro impedindo o reconhecimento dos trofozoítos como componentes estranhos pelo sistema imunológico (PETERSON e ALDERETE, 1982).

### I.2.2. Imunidade

A resposta imune é ativada por múltiplos mecanismos que operam em diferentes níveis, incluindo alteração da composição das células imunes nos tecidos, mudanças na resposta das células a estímulos, regulação de vias de sinalização e controle em nível de expressão gênica (MEDZHITOV e HORNG, 2009). Nas mucosas, como o trato urogenital, o sistema imune desempenha um papel importante na homeostasia através de seus mecanismos inatos e adaptativos, controlando a constante exposição a microrganismos patogênicos e alérgenos (DE LIMA e ALVES, 2008; CHAPLIN, 2010).

### I.2.2.1. Resposta Imune Inata

A infecção por *T. vaginalis* é frequentemente recorrente, sem imunidade permanente, sugerindo a importância da resposta imune inata (FICHOROVA, 2009). Esta é considerada a primeira linha de defesa contra microrganismos da mucosa vaginal, atuando via indução de citocinas pró-inflamatórias e fatores antimicrobianos, e via estimulação da resposta imune adaptativa (CAUCI e CULHANE, 2007).

O lipofosfoglicano (LPG), glicoconjugado mais abundante da superfície celular de *T. vaginalis*, liga-se a uma proteína da classe das galectinas presente nas CEVs de maneira carboidrato-dependente e auxilia na adesão do parasito (OKUMURA *et al.*, 2008). Após a aderência, ocorre o desenvolvimento de uma resposta inflamatória específica acompanhada do aumento de quimiocinas selecionadas pelas células epiteliais vaginais e cervicais. As quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória incluem principalmente, a interleucina (IL) 8, o leucotrieno B4 (RYU *et al.*, 2004; KUCKNOOR *et al.*, 2007) e a proteína inflamatória 3 $\alpha$  de macrófagos (FICHOROVA, 2009).

Neutrófilos são as células inflamatórias predominantes encontradas na secreção vaginal de pacientes com tricomonose. Ryu *et al.* (2004) demonstraram que os trofozoítos vivos induzem a produção de IL-8 em neutrófilos através das vias de sinalização do fator nuclear (NF) $\kappa$ B e da proteína mitógeno ativada (MAP) quinase. Por outro lado, os parasitos induzem apoptose de neutrófilos através da ativação de caspase-3 e redução da expressão de Mcl-1, uma proteína antiapoptótica de neutrófilos (KANG *et al.*, 2006). Recentemente, foi demonstrado que a ativação de caspase-3 dependente de espécies reativas de oxigênio desempenha um importante papel na apoptose de neutrófilos induzida por *T. vaginalis* (SONG *et al.*, 2008). Além disso, neutrófilos em apoptose-*T. vaginalis* induzida, mantidos em interação com macrófagos, provocaram aumento na produção de IL-10, uma interleucina anti-inflamatória, e diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator

de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-6, reduzindo a resposta inflamatória (AHN *et al.*, 2008).

A IL-8 é uma importante citocina quimioatraente para neutrófilos e macrófagos e a sua presença no fluido vaginal é indicativa de condições inflamatórias agudas e crônicas no trato genital feminino (SINGH *et al.*, 2009). Além disso, ela está positivamente associada com a IL-1, quimiocina proinflamatória responsável por uma cascata de respostas imunes inata e adaptativa. A produção do subtipo IL-1 $\beta$  é aumentada em resposta a vários patógenos, entre eles o *T. vaginalis* (CAUCI e CULHANE, 2007). Essa interleucina está presente em grandes quantidades no meio intracelular de células epiteliais e assim como o TNF- $\alpha$ , presente em menores quantidades, é liberada quando ocorre um dano ao epitélio celular. Ambos, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , induzem a ativação de NF $\kappa$ B que, tratando-se de um fator de transcrição, induz a expressão de citocinas proinflamatórias, quimiocinas e defensinas na resposta inflamatória induzida pela tricomonose (FICHOROVA *et al.*, 2006).

Outro composto envolvido na resposta imune inata à infecção por *T. vaginalis* é o óxido nítrico (NO). O NO é uma molécula gasosa permeável às membranas plasmáticas que atua como sinalizador ou agente tóxico sobre as células. Ele é produzido por diversos tipos celulares e, em mamíferos, promove relaxamento muscular, atua como neurotransmissor e inibe a agregação plaquetária. Além disso, desempenha uma variedade de funções imunes – atua como indutor ou supressor da apoptose, imunoregulador e agente tóxico contra organismos infecciosos (COLEMAN, 2001). O NO é sintetizado a partir da L-arginina e de oxigênio molecular por uma enzima chamada óxido nítrico sintase (NOS), em um processo dependente de NADPH. A forma induzível de NOS (iNOS) é expressa pela maioria dos tecidos, à exceção das células neurais e endoteliais, e produz NO após ativação celular. Na tricomonose, o NO sintetizado especialmente por macrófagos, exerce atividade citotóxica contra o parasito, além de promover a liberação de citocinas e ativar moléculas de adesão (HAN *et al.*, 2009).

A infecção por *T. vaginalis* ativa receptores TLR (do inglês, *Toll-like receptor*) 4 (FICHOROVA, 2009) que desempenham funções críticas na resposta imune inata reconhecendo patógenos (CHAPLIN, 2010). A indução de uma atividade estimulatória de TLR4 pelo parasito pode resultar na ativação de células recrutadas para o trato genital ou de células do próprio trato genital. No entanto, interessante, as células epiteliais da vagina humana não expressam TLR4, o que sugere que elas não são estimuladas por este mecanismo durante a infecção. Diferentemente, neutrófilos, monócitos e macrófagos expressam o receptor, justificando a resposta inflamatória promovida pela migração de leucócitos para o trato genital. Esses achados também são fatores que podem levar a tricomonose de assintomática à sintomática (ZARIFFARD *et al.*, 2004).

#### I.2.2.2. Resposta Imune Adaptativa

Apesar da imunidade inata desempenhar papel de destaque na defesa contra *T. vaginalis*, a resposta imune adaptativa também exerce sua função na tentativa de eliminar este patógeno de mucosa. Ambas atuam concomitantemente frente à tricomonose; enquanto a resposta inata contribui para a ativação da adaptativa, essa última intensifica ainda mais o recrutamento da imunidade inata (CHAPLIN, 2010). Esta associação confere um controle constante da exposição do trato genital ao protozoário.

Embora em alguns casos da doença tenha sido reportada a ausência de anticorpos vaginais detectáveis (ABRAHAM *et al.*, 1996), a infecção por *T. vaginalis* em humanos resulta em anticorpos parasito-específicos no trato reprodutivo (SCHWEBKE e BURGESS, 2004). Somente as classes de imunoglobulinas (Ig) A e G foram detectadas nas secreções vaginais de mulheres com tricomonose aguda (YADAV *et al.*, 2005). IgE, se encontrada no trato genital, ocorre em baixa concentração (ACKERS, 1990). Em homens, anticorpos IgG1 e IgM podem estar

envolvidos no estabelecimento de tricomonose sintomática, comparados aos casos assintomáticos (IMAM *et al.*, 2007).

Na maioria dos casos de tricomonose a presença de anticorpos também é detectada no soro do indivíduo infectado (SCHWEBKE e BURGESS, 2004). IgGs contra diversos tipos de cisteína proteases do parasito já foram descritas (YADAV *et al.*, 2005). IgM e IgA também estão presentes no soro desses pacientes, sendo a última um potencializador da opsonização de células alvo durante a fagocitose por polimorfonucleares. Diferentemente, a IgE nunca é detectada em soro humano (ACKERS, 1990).

No entanto, apesar da produção e/ou secreção de anticorpos contra *T. vaginalis* no trato genital e no soro, esses promovem uma proteção limitada ao parasito, decaindo progressivamente após a erradicação da doença por tratamento. De seis a doze meses após a infecção, nem anticorpos específicos a *T. vaginalis* nem células B de memória estão presentes na circulação, deixando o hospedeiro sem defesa contra uma infecção subsequente (CUDMORE *et al.*, 2004). Os baixos níveis de resposta humoral encontrados na tricomonose podem ser devidos a uma interação não invasiva entre o patógeno de mucosa e o hospedeiro humano (PAINTLIA *et al.*, 2002).

### I.3. Sistema Purinérgico

#### I.3.1. Nucleotídeos e Nucleosídeos Extracelulares e Purinoceptores

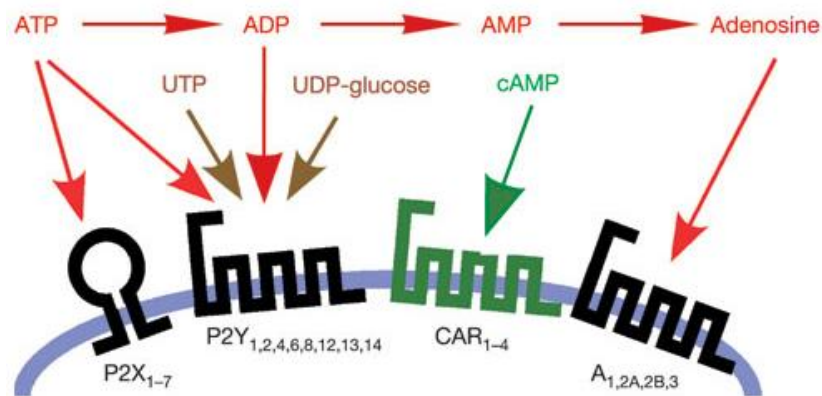
Nucleotídeos e nucleosídeos são moléculas amplamente distribuídas nos sistemas orgânicos dos animais, onde são capazes de produzir efeitos através de mecanismos intra ou extracelulares. Além da função bastante consolidada do ATP no metabolismo energético intracelular, este nucleotídeo extracelularmente contribui para a regulação de uma variedade de processos biológicos, incluindo função cardíaca,



neurotransmissão, contração muscular, vasodilatação, metabolismo ósseo, gastrointestinal, hepático e inflamação (YEGUTKIN, 2008).

O conceito de neurotransmissão purinérgica foi inicialmente proposto na década de 70 (BURNSTOCK, 1972), e desde então a função sinalizadora do ATP e de outros nucleotídeos (ADP, UTP, UDP) vêm sendo estabelecida. A secreção celular dessas purinas ocorre via transportadores, difusão através de canais de membrana e exocitose (ABBRACCHIO *et al.*, 2009), e é reconhecidamente mediada por injúria e dano celular (BURNSTOCK, 2007). Após a liberação dos nucleotídeos para o espaço extracelular, esses são degradados enzimaticamente por uma família de ectonucleotidases (ZIMMERMANN, 2001), produzindo uma série de nucleotídeos intermediários e nucleosídeos, que por sua vez também atuam como moléculas sinalizadoras.

Esses diversos transmissores purinérgicos desenvolvem seus efeitos através da ativação de um grande número de receptores de membrana denominados purinoceptores (BURNSTOCK, 1976), os quais foram separadamente classificados como P1 e P2. A classe de receptores metabotrópicos P1 compreende quatro subtipos, A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, os quais permitem a ligação de adenosina extracelular com diferentes afinidades (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998; FREDHOLM *et al.*, 2001). Estes receptores encontram-se acoplados a proteínas G e exercem seus efeitos através da adenilato ciclase, sendo A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> capazes de inibi-la, enquanto A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> são responsáveis por sua ativação, com consequente produção de AMP cíclico (cAMP) (FREDHOLM *et al.*, 2001). Os receptores de nucleotídeos P2 foram divididos em duas subfamílias, P2X e P2Y, com base em dados farmacológicos, funcionais e moleculares. A classe P2X é composta por sete subtipos (P2X<sub>1-7</sub>) de receptores ionotrópicos, os quais são ativados por ATP e permeáveis aos cátions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> (NORTH, 2002; BURNSTOCK, 2007). Os receptores P2Y são metabotrópicos acoplados a proteínas G e 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>, P2Y<sub>14</sub>, compartilhando sete domínios transmembrana (Figura 3) (ABBRACCHIO *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Catabolismo extracelular dos nucleotídeos e potencial ativação dos receptores pelos nucleotídeos (receptores P2) e adenosina (receptores P1). Os receptores P2X são ligados a canal iônico, enquanto os receptores da classe P2Y e P1 são acoplados a proteínas G e apresentam sete domínios transmembrana. O AMP cíclico (cAMP) atua sobre uma família de quatro receptores de cAMP (CAR). Adaptado de Khakh e North, 2006.

### I.3.2. ATP e Adenosina: Papel na Inflamação

Moléculas sinalizadoras, como ATP e outros nucleotídeos, são liberadas pelas células em resposta à injúria tecidual ou a patógenos exógenos (NATHAN, 2002; BOURS *et al.*, 2006). O ATP extracelular pode atuar como um composto endógeno capaz de modular processos inflamatórios e respostas imunes através de complexos mecanismos desempenhados sobre diversos tipos celulares (DI VIRGILIO, 2005). Além disso, a função do ATP na imunidade está atrelada a um dos seus produtos de degradação, o nucleosídeo adenosina. A adenosina tem um papel bem estabelecido como agente supressor de respostas imunes e inflamação (HASKÓ e CRONSTEIN, 2004).

As concentrações intracelulares de ATP são bastante elevadas (3-10 mM) contrastando com aquelas encontradas extracelularmente (400-700 nM); no entanto, essas concentrações podem aumentar significativamente sob condições como isquemia, hipóxia ou inflamação (BODIN e BURNSTOCK, 2001). Nessas situações, o ATP atua como uma molécula associada ao dano, DAMP (do inglês, *Damage-*

*Associated Molecular Patterns*), iniciando e regulando respostas imunes em cooperação com outras moléculas sinalizadoras (SEONG e MATZINGER, 2004). Os efeitos induzidos pelo ATP via ligação a receptores P2 incluem a produção de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18 e TNF- $\alpha$  por células imunes e o recrutamento de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos. Nos neutrófilos, as primeiras células imunes envolvidas em processos inflamatórios, o ATP estimula a degranulação, promove a adesão às células endoteliais, retarda a apoptose e induz a produção de espécies reativas de oxigênio (BOURS *et al.*, 2006).

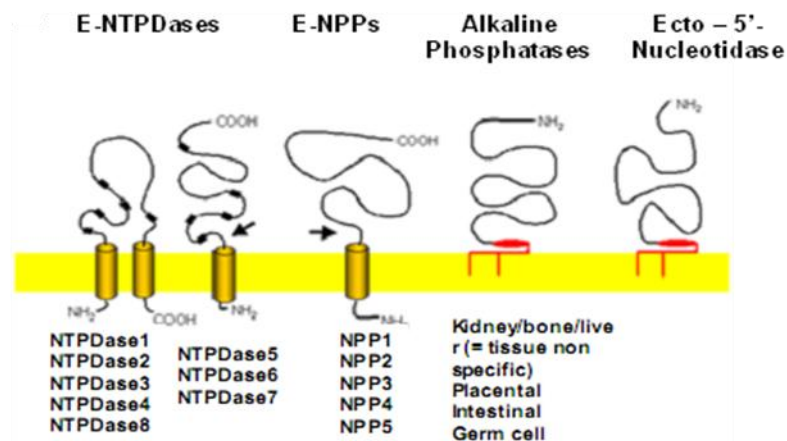
Por outro lado, muitos dos efeitos provocados pelo ATP extracelular podem ser revertidos pela ação de seu nucleosídeo. As concentrações de adenosina, assim como de ATP, também se elevam significativamente em condições de estresse celular, e esse aumento pode ser atribuído à secreção por células endoteliais e neutrófilos, mas principalmente, pela cascata enzimática das ectonucleotidases, que levam à produção de adenosina a partir do ATP (HASKÓ e CRONSTEIN, 2004). Em neutrófilos, altas concentrações de adenosina promovem a ligação desta aos receptores A<sub>2A</sub>, com consequentes efeitos anti-inflamatórios, como: inibição da degranulação e adesão às células endoteliais, diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio, de citocinas e do leucotrieno B<sub>4</sub>. Diferentemente, em baixas concentrações, a adenosina tem maior afinidade aos receptores A<sub>1</sub> e passa a desempenhar um papel inflamatório (KUMAR e SHARMA, 2009). No entanto, uma vez que o sítio de injúria apresenta altas concentrações do nucleosídeo, os efeitos anti-inflamatórios promovidos pela ligação aos receptores A<sub>2A</sub> se sobrepõe àqueles causados pelos receptores A<sub>1</sub>.

### I.3.3. Ectonucleotidases

Uma variedade de enzimas localizadas na superfície celular é capaz de degradar nucleotídeos extracelulares, levando à formação de seus respectivos nucleosídeos e fosfato livre. Essas enzimas fazem parte de diferentes famílias de ectonucleotidases e compartilham características comuns, tais como: (i) sítio catalítico voltado para o meio

extracelular ou para o lúmen de organelas, (ii) ligação à membrana plasmática ou de organelas como lisossomos ou complexo de Golgi e presença de isoformas extracelulares clivadas e solúveis, (iii) atividade catalítica máxima dependente de cátions divalentes como cálcio ou magnésio, e de pH levemente alcalino, e (iv) valores de  $K_M$ , geralmente, na faixa de micromolar (ZIMMERMANN, 2000).

As famílias de ectonucleotidases se sobrepõem tanto na distribuição tecidual quanto na especificidade aos substratos. Dessa forma, nucleosídeos 5'-tri- e difosfatados podem ser hidrolisados por membros das famílias E-NTPDase (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), E-NPP (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase) e pelas fosfatases alcalinas. Os nucleosídeos 5'-monofosfatados estão sujeitos à hidrólise pela ação da ecto-5'-nucleotidase, das fosfatases alcalinas e provavelmente, por alguns membros da família E-NPP (Figura 4) (ZIMMERMANN, 2001). O principal papel funcional destas enzimas está baseado no término da sinalização por nucleotídeos, seguido pela recaptação de purinas (ZIMMERMANN, 2000).



**Figura 4.** Topografia preditiva de membrana das ectonucleotidases. As NTPDases 1-4 e a NTPDase 8 estão ligadas à membrana plasmática através de dois domínios transmembrana, N- e C-terminal. As NTPDases 5, 6 e 7 não possuem o domínio transmembrana C-terminal e podem ser clivadas no domínio N-terminal para formar uma proteína solúvel e secretada (seta preta). Os membros da família E-NPP são proteínas de membrana do tipo II e podem ser clivadas dando origem a uma forma solúvel (seta preta). A ecto-5'-nucleotidase, assim como as quatro formas de fosfatases alcalinas, está ancorada à membrana plasmática por glicosilfosfatidil inositol (GPI), e pode sofrer clivagem resultando em uma enzima solúvel. Os quadros escuros nas sequências das NTPDases representam as regiões conservadas da apirase (ACRs). Adaptado de Zimmermann, 2001.

### I.3.3.1. Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase, EC 3.6.1.5)

Nos últimos anos, progressos consideráveis têm sido realizados na caracterização da família E-NTPDase. Esta família de enzimas conta com oito membros já caracterizados e clonados em mamíferos (ZIMMERMANN, 2001; BIGONNESSE *et al.*, 2004). Além disso, NTPDases também são encontradas em outros vertebrados, invertebrados, plantas, fungos e protozoários (HANDA e GUIDOTTI, 1996; VASCONCELOS *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 1997; ZIMMERMANN, 2001).

Estas enzimas hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados, embora com diferenças marcantes em relação à preferência pelos tipos de nucleotídeos. Por exemplo, entre os membros 1, 2, 3 e 8, os quais são expressos na superfície celular, a NTPDase 1 (CD39) hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, enquanto a NTPDase 2 (CD39L1) demonstra uma preferência 30 vezes maior por ATP comparado ao ADP. Já, as NTPDases 3 (CD39L3) e 8 preferem o ATP ao ADP numa proporção de cerca de 3:1 e 2:1, respectivamente. Diferentemente das anteriores, as NTPDases 4-7 encontram-se associadas às membranas de organelas intracelulares. A NTPDase 4 (hLALP70) apresenta duas formas, uma ancorada ao complexo de Golgi e a outra localizada em vacúolos lisossomais/autofágicos. Ambas as enzimas hidrolisam nucleotídeos tri- e difosfatados com maior preferência por UTP e UDP. As NTPDases 5 (CD39L4) e 6 (CD39L2) têm a sequência hidrofóbica N-terminal, no entanto não apresentam o domínio transmembrana C-terminal. A primeira é ligada ao retículo endoplasmático, e a segunda ao complexo de Golgi. As duas enzimas hidrolisam com maior preferência nucleotídeos difosfatados, e podem secretar suas formas solúveis após uma clivagem proteolítica. Por fim, a NTPDase 7 (LALP1) é localizada em vesículas intracelulares e prefere nucleotídeos trifosfatados (MULERO, 1999; ZIMMERMANN, 2000).

Os membros da família E-NTPDase podem variar consideravelmente em relação à identidade de suas sequências; entretanto, cinco domínios altamente

conservados, as ACRs (do inglês, *apyrase conserved regions*), são compartilhados por todas as sequências e considerados marcadores da família. Além disso, as ACRs provavelmente têm papel importante na atividade catalítica (HANDA e GUIDOTTI, 1996).

A atividade de uma NTPDase  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ -dependente já foi caracterizada em *T. vaginalis* (MATOS *et al.*, 2001). A atividade enzimática observada em trofozoítos intactos, aliada à evidência de domínio C-terminal na proteína reforça a ideia de uma ecto-NTPDase ancorada à superfície de *T. vaginalis*. Além disso, quatro genes encontrados no genoma do parasito são descritos como prováveis responsáveis pela codificação da proteína (SANSOM *et al.*, 2008).

#### I.3.3.2. Ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5)

A ecto-5'-nucleotidase representa um marcador de maturação de linfócitos T e B, e se encontra ancorada à membrana plasmática por glicosilfosfatidil inositol (GPI). Formas solúveis da enzima podem ser originadas mediante ação de uma fosfolipase específica. A atividade da ecto-5'-nucleotidase corresponde ao passo final da cascata de degradação de nucleotídeos extracelulares, levando à formação de nucleosídeos e fosfato livre a partir de nucleosídeos 5'-monofosfatados. Sendo o AMP a molécula de maior preferência, a enzima é considerada a principal responsável pela produção de adenosina extracelular, que subsequentemente levará à ativação de receptores P1. A ecto-5'-nucleotidase tem ampla distribuição pelos tecidos, onde desempenha uma variedade de funções, incluindo adesão celular (ZIMMERMANN, 1992; RESTA e THOMPSON, 1997b).

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

Junto com a ecto-5'-nucleotidase, outra enzima torna-se importante na regulação dos níveis extracelulares de adenosina, a adenosina deaminase (ADA). Além de sua localização citosólica bastante conhecida, a ADA também pode ser expressa como uma ectoenzima (ectoADA) na membrana plasmática de diversas células imunes e não imunes, ancorada a duas proteínas, CD26 e receptores A<sub>1</sub> de adenosina. A ectoADA é considerada uma enzima chave no metabolismo de purinas, catalisando a deaminação irreversível da adenosina e 2'-deoxiadenosina à inosina e 2'-deoxiinosina, respectivamente (FRANCO *et al.*, 1997). Fisiologicamente, a deficiência congênita da ADA é capaz de causar a Síndrome da Imunodeficiência Severa Combinada, com redução significativa do número de células T e B e consequente aumento do risco de infecções (RESTA e THOMPSON, 1997a).

#### I.3.5. Ectonucleotidases e adenosina deaminase em *T. vaginalis*

A hidrólise de nucleotídeos extracelulares pelas ectonucleotidases de *T. vaginalis*, assim como em outros protozoários, representa uma alternativa de evasão do parasito frente aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Além disso, a cascata de degradação enzimática leva à produção de adenosina, que além de desempenhar um papel importante na limitação da resposta inflamatória, também é fundamental para a manutenção do crescimento e sobrevivência do parasito.

A comparação entre as atividades da NTPDase em *T. vaginalis* intactos e rompidos demonstrou a presença de uma enzima de superfície capaz de hidrolisar ATP e ADP igualmente bem, e cuja atividade é Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>-dependente (MATOS *et al.*, 2001). A investigação de sequências no genoma do parasito revelou a presença de genes que codificam proteínas com regiões similares às cinco ACRs, presentes em todas as NTPDases. A partir das sequências encontradas e de evidências experimentais, as proteínas codificadas por estes genes parecem estar ancoradas à

membrana plasmática através de um domínio transmembrana C-terminal, o que indica fortemente que estas atuam como ectoenzimas (TASCA *et al.*, 2004; SANSOM *et al.*, 2008).

A atividade da NTPDase pode estar relacionada com alguns fatores de virulência e patogenicidade de *T. vaginalis*. O carboidrato <sub>D</sub>-Galactose, sabidamente envolvido na adesão do parasito às células do hospedeiro, demonstrou aumentar 90% a atividade da enzima, sugerindo um possível papel da NTPDase na aderência (DE JESUS *et al.*, 2002). Além disso, hormônios esteróides, os quais se encontram em constante flutuação no ambiente vaginal e influenciam a ocorrência de sintomas na tricomonose, são capazes de regular a atividade da enzima refletindo nos níveis de ATP e ADP extracelular, e podendo assim modular a colonização por *T. vaginalis* (RÜCKERT *et al.*, 2010). De maneira importante, isolados clínicos apresentam maior atividade da NTPDase quando comparados àqueles cultivados por longos períodos em laboratório, sugerindo a importância dessa ectonucleotidase na virulência do parasito (TASCA *et al.*, 2005).

A atividade de uma ecto-5'-nucleotidase presente na superfície externa de células intactas de *T. vaginalis* também já foi caracterizada. A enzima exibe uma significativa preferência por AMP e apesar de não ser dependente de cátions divalentes, concentrações milimolares de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> promovem ativação enzimática (TASCA *et al.*, 2003). Assim como relatado para a NTPDase, a ecto-5'-nucleotidase também parece estar envolvida em mecanismos de patogênese. O ferro é um importante modulador de fatores de virulência, como adesinas (ALDERETE *et al.*, 2004) e proteases (ALDERETE *et al.*, 1995). Isolados clínicos de *T. vaginalis* cultivados em meio enriquecido com ferro mostram atividade aumentada de ecto-5'-nucleotidase, diferentemente dos parasitos mantidos em meio com baixas concentrações de ferro, os quais têm sua atividade enzimática diminuída. As altas taxas de crescimento e multiplicação dos parasitos em um ambiente rico em ferro são capazes de promover resposta inflamatória no hospedeiro, o que pode ser contrabalanceado pelo efeito anti-inflamatório da adenosina gerada pela ecto-5'-



nucleotidase (TASCA *et al.*, 2005). Além disso, os efeitos complexos desencadeados pela ação dos hormônios esteróides também podem modular a atividade da enzima, influenciando as condições patofisiológicas do hospedeiro (RÜCKERT *et al.*, 2009). No entanto, alguns isolados não apresentam atividade de ecto-5'-nucleotidase, o que pode representar um impacto na sintomatologia da tricomonose, considerando as baixas concentrações de adenosina disponíveis no sítio da infecção (TASCA *et al.*, 2005).

Outra enzima importante, a ADA, atua em conjunto com a ecto-5'-nucleotidase modulando os níveis de adenosina extracelular. A enzima tem sido descrita em células e tecidos de mamíferos, insetos hematófagos, moluscos e diversos parasitos, *Plasmodium lophurae*, *Trichinella spiralis*, *Fasciola gigantica* e *Hyalomma dromedarii* (FRANCO *et al.*, 1997; GOUNARIS, 2002; MOHAMED, 2006; ALI, 2008). A caracterização e a expressão de S-adenosilhomocisteinase foram descritas em *T. vaginalis*, a qual catalisa a hidrólise reversível de S-adenosilhomocisteína a homocisteína e adenosina (MINOTTO *et al.*, 1998). Neste estudo, os autores relataram ausência ou pouca atividade de ADA. Por outro lado, a adenosina é o precursor primário do *pool* de nucleotídeos púricos em *T. vaginalis*, e atividades de ADA, IMP desidrogenase e GMP sintetase foram identificadas nos parasitos (MUNAGALA e WANG, 2003). Em recente trabalho do nosso grupo (dados não publicados), a atividade da ADA em trofozoítos intactos de *T. vaginalis* foi caracterizada, sugerindo a ocorrência de uma ectoADA no parasito. Além disso, após inibição da ecto-5'-nucleotidase a atividade da ADA foi completamente abolida, demonstrando uma forte associação entre as enzimas. A presença de uma ADA na superfície dos trofozoítos pode ser importante para regulação dos níveis de adenosina e inosina durante a infecção e, conseqüentemente, para manutenção das propriedades anti-inflamatórias desempenhadas por ambas as substâncias.

Como resultado da lise de CEVs, a concentração de nucleotídeos púricos livres na vagina durante a infecção pode atingir até 10 mM, sendo que 90% destes correspondem ao ATP (MUNAGALA e WANG, 2003). A hidrólise do ATP, ADP e

AMP pelas ectonucleotidases de *T. vaginalis* é uma estratégia importante para a modulação da concentração dos nucleotídeos no espaço extracelular, protegendo os parasitos dos efeitos citotóxicos do ATP e produzindo adenosina, cujos efeitos supressores e imunomoduladores também contribuem para o estabelecimento da infecção. Além disso, *T. vaginalis* não realiza síntese *de novo* de purinas, e seu crescimento e sobrevivência tornam-se dependentes das vias de salvação (HEYWORTH *et al.*, 1982; 1984).

---

---

## I.4. Objetivos



Considerando (i) o impacto da tricomonose na saúde pública, (ii) o papel dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares na inflamação, (iii) a presença de ectonucleotidases já caracterizadas em *T. vaginalis*, (iv) a busca por uma melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro e, (v) a necessidade de investigação de novos alvos terapêuticos para o tratamento da tricomonose, os objetivos gerais deste estudo foram:

- Avaliar o perfil da NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis* em uma condição de limitação de nutrientes;
- Investigar a participação do sistema purinérgico na produção de óxido nítrico por neutrófilos estimulados com *T. vaginalis*.

Os objetivos específicos propostos foram:

- Avaliar as atividades enzimáticas da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em trofozoítos de *T. vaginalis*, sob uma condição de limitação de soro;
- Investigar o efeito da limitação de soro na expressão gênica da NTPDase de *T. vaginalis*;
- Analisar o metabolismo do ATP em *T. vaginalis*, sob a condição de limitação de soro;
- Investigar o efeito da limitação de soro no ciclo celular de *T. vaginalis*;
- Avaliar o efeito de nucleotídeos/nucleosídeo da adenina, inibidores enzimáticos, agonistas e antagonistas de purinoceptores na produção de óxido nítrico por neutrófilos estimulados com trofozoítos de *T. vaginalis*.



## **PARTE II**





---

---

## II. Artigos Científicos



II.1. CAPÍTULO 1 - Amanda Piccoli Frasson, Mariele Feiffer Charão, Denis Broock Rosemberg, Ana Paula de Souza, Solange Cristina Garcia, Cristina Bonorino, Maurício Reis Bogo, Geraldo Attilio De Carli, Tiana Tasca. Analysis of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase profile in serum-deprived *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology** (submetido)

**Analysis of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase profile in serum-deprived *Trichomonas vaginalis***

Amanda Piccoli Frasson<sup>a</sup>, Mariele Feiffer Charão<sup>b</sup>, Denis Broock Rosenberg<sup>c</sup>, Ana Paula de Souza<sup>d</sup>, Solange Cristina Garcia<sup>b</sup>, Cristina Bonorino<sup>d</sup>, Maurício Reis Bogo<sup>e</sup>, Geraldo Attilio De Carli<sup>f</sup>, Tiana Tasca<sup>a\*</sup>

a. Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

b. Laboratório de Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

c. Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

d. Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

e. Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12C – Sala 172, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

f. Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Running title:** NTPDase and ecto-5'-nucleotidase profile in serum-deprived *Trichomonas vaginalis*

**\* Corresponding Author (Tiana Tasca)**

Tel.: +55-51-3308-5325; fax: +55-51-3308-5437. *E-mail address:*  
tiana.tasca@ufrgs.br

## SUMMARY

*Trichomonas vaginalis* is a parasite from the human urogenital tract that causes trichomonosis, the most prevalent non-viral sexually transmitted disease. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) members, which hydrolyse extracellular ATP and ADP, and ecto-5'-nucleotidase, which hydrolyses AMP, have been characterised in *T. vaginalis*. In trichomonads cultivation, the medium is supplemented with 10% serum, an important source of nutrients, including adenosine. Here we investigated the metabolism of ATP in trophozoites of *T. vaginalis*, long-term-grown and clinical isolates, under a condition of bovine serum limitation (1.0% serum). Specific enzymatic activities were expressed as nmol Pi released/min/mg protein, gene expression patterns were carried out by RT-PCR, extracellular adenine nucleotide hydrolysis by HPLC, and the cell cycle analysis was assessed by flow cytometry. The serum limitation caused a strong activation of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities. Furthermore, NTPDase A and B transcripts have increased and extracellular ATP metabolism was activated leading to higher ATP hydrolysis and formation of ADP and AMP. Moreover, the cell cycle was arrested at G0/G1 stages, suggesting adenosine uptake. Our data suggest that, in a situation of serum limitation, NTPDase and ecto-5'-nucleotidase play a role in providing adenosine for *T. vaginalis* growth, which contributes to the establishment of parasitism.

**Key words:** *Trichomonas vaginalis*; serum limitation; ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase; ecto-5'-nucleotidase; adenosine.

## INTRODUCTION

Trichomonosis, caused by the flagellate protozoan *Trichomonas vaginalis*, is the most common non-viral sexually transmitted disease (STD), with an estimated 174 million new cases a year (WHO, 2001). The infection has been associated with serious health consequences for women, including adverse pregnancy outcomes (Cotch *et al.* 1997), infertility (Goldstein *et al.* 1993), predisposition to cervical cancer (Viikki *et al.* 2000), and pelvic inflammatory disease (Cherpes *et al.* 2006). Trichomonosis among men is a recognised cause of urethritis, and complications such as prostatitis, epididymitis and infertility have been described (Johnston and Mabey, 2008). Moreover, the infection is a co-factor in human immunodeficiency virus (HIV) transmission and acquisition (Van Der Pol *et al.* 2008). Considering that the host–parasite relationship is very complex (Lehker and Alderete, 2000) and that the broad range of clinical symptoms cannot be easily attributed to a single pathogenic mechanism, it is important to study biochemical properties of the parasite that contribute to better understand these aspects.

Nucleotides such as ATP, ADP and AMP, and their nucleoside derivative, adenosine, are found in all animal organ systems where they produce effects both by intracellular and extracellular mechanisms (Yegutkin, 2008). Extracellular nucleotides and nucleosides are involved in diverse biological and pathological processes, and their effects are mediated via a series of selective receptors, purinergic type 1 (P1) and type 2 (P2) (Burnstock, 2007; Sansom *et al.* 2008). Ectonucleotidases, a group of ectoenzymes involved in the control of nucleotide and nucleoside levels, can inactivate these molecules by hydrolysis. These enzymes include the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family, which hydrolyse nucleoside tri- and diphosphates, and the ecto-5'-nucleotidase, which hydrolyses nucleoside monophosphates (Zimmermann, 2001; Robson *et al.* 2006). Therefore, considering that *T. vaginalis* lacks *de novo* purine synthesis, the hydrolysis promoted by the ectonucleotidase cascade may provide the primary precursors of purine nucleotides in the parasite (Heyworth *et al.* 1982; Munagala and Wang, 2003). Previous studies from

our group have already characterised NTPDase (Matos *et al.* 2001) and ecto-5'-nucleotidase (Tasca *et al.* 2003, 2005) activities in trophozoites of *T. vaginalis*.

*In vivo* bacterial autolysis and sloughed endometrial cells provide a rich source of purines and pyrimidines for *T. vaginalis*. The parasites are known to be phagocytic and the contribution of phagocytosis to nutrient acquisition is advantageous for the parasite, since the vaginal cavity is a hostile environment with scarce nutrients (Pereira-Neves and Benchimol, 2007). *In vitro*, the culture medium is supplemented with bovine, horse or human serum, an important source for nutrition of the trophozoites (Linstead, 1990). In mammalian cells, it was demonstrated that serum deprivation alters the cellular growth and promotes the increase in the incorporation of adenosine into adenine nucleotides (Rapaport and Zamecnik, 1978). In this sense, considering that (i) trichomonads have no ability to perform *de novo* purine and pyrimidine synthesis and (ii) the serum added to the medium represents a source of nucleosides, we hypothesised that in a situation of nutrient limitation (serum deprivation) the ectonucleotidases of *T. vaginalis* could participate in the provision of adenosine for parasite growth. Therefore, the main goal of the present study was to evaluate, for the first time, the effect of bovine serum limitation on NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities and expression profile and also, to investigate the ATP metabolism and the *T. vaginalis* cell cycle behavior under this condition.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Culture of T. vaginalis*

*T. vaginalis* isolates, 30236 (from the American Type Culture Collection) and LACH1, a fresh clinical isolate (from Laboratório de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Brazil), were used in this study. Trichomonads were cultured axenically *in vitro* on trypticase–yeast extract–maltose (TYM) medium, (pH 6.0), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated bovine serum (HIBS), and incubated at 37°C ( $\pm 0.5$ ) (Diamond, 1957). Organisms in the logarithmic phase of growth

exhibiting motility and normal morphology were harvested, centrifuged, washed three times with phosphate buffered saline 1X (PBS) and resuspended on new TYM medium for the experiments.

#### *Kinetic growth curve and serum limitation conditions*

In order to investigate the influence of the serum limitation on *T. vaginalis* growth, experiments on the kinetic growth curve were performed with both isolates, with an initial inoculum of  $1.0 \times 10^5$  trophozoites/ml, in presence of 1.0% (v/v) HIBS, on TYM medium. The results were expressed as the percentage of living organisms compared to parasite control (10% HIBS), and are representative of at least three independent experiments (different cultures).

For the next assays, performed after kinetic growth curves, trichomonads ( $1.0 \times 10^5$  trophozoites/ml) of ATCC 30236 isolate were grown on TYM medium supplemented with 1.0% (v/v) HIBS for 2 hours, while the LACH1 isolate remained for 24 hours under the same conditions.

#### *Enzyme assays*

Trophozoites were harvested and washed three times with 0.9% (w/v) NaCl solution, and the viability was checked using trypan blue (0.2%) dye exclusion. The parasites suspension was diluted to a final protein concentration of approximately 0.6 mg/ml (30236 isolate) or 0.4 mg/ml (LACH1 isolate) to ensure linearity in the enzyme assays. Protein was measured by the Coomassie Blue method (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as standard.

Intact organisms were added to the NTPDase reaction mixture (50 mM Tris buffer, pH 7.2, and 5.0 mM  $\text{CaCl}_2$ ) for measuring ATP and ADP hydrolysis (Matos *et al.* 2001). The same density of parasites was added to the ecto-5'-nucleotidase reaction mixture (50 mM Tris buffer, pH 7.5, and 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ) (Tasca *et al.* 2003). The samples were preincubated for 5 min at 37 °C in 200  $\mu\text{l}$  of the reaction mixture. The reaction started with the addition of substrates: ATP and ADP (final concentration 1.0 mM), for NTPDase assay, and AMP (final concentration 3.0 mM), for ecto-5'-



nucleotidase assay. The reaction was terminated by adding 200 µl of 10% (v/v) trichloroacetic acid (TCA). The samples were chilled on ice for 10 min before the release of inorganic phosphate (Pi) measurement (Chan *et al.* 1986). Controls included intact organisms added to the reaction mixtures containing TCA in order to correct non-enzymatic hydrolysis of substrates, and the averages of control values were subtracted from the test samples. Specific activity was expressed as nmol Pi released/min/mg of protein. All samples were run in triplicate at least in three independent experiments (different cultures).

#### *Analysis of gene expression by RT-PCR*

*T. vaginalis* gene expression patterns were carried out by a semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. NTPDase sequences were found by analysis in BLAST function, GenBank database and specific primers for NTPDase A and B were designed (Table 1) (Carlton *et al.* 2007).

After the period of serum limitation, *T. vaginalis* trophozoites were centrifuged and washed three times with PBS buffer (pH 7.2) for total RNA extraction using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in accordance with manufacturer instructions. The purity of the RNA was spectrophotometrically quantified by calculating the ratio between absorbance values at 260 and 280 nm. Afterwards, cDNA species were synthesised using SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following supplier's from 2.0 µg of total RNA. PCR reactions were performed in a volume of 20 µl using 0.1 µM of specific primers for NTPDase, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.5 U Taq Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in the supplied reaction buffer. The sequence of *α-tubulin* primers were in accordance with previously described data (Kucknoor *et al.* 2005) and the PCR conditions were performed in accordance to previous studies (Giordani *et al.* 2010; Rückert *et al.* 2010), using 0.5 M betain. All assays were carried out using 1.0 µl of cDNA template. PCR conditions for NTPDase were as follows: initial 1 min denaturation step at 94°C, 1 min annealing step (NTPDase A and B) (Carlton *et al.* 2007) at 53°C, 2 min extension step at 72°C for 30 cycles and a 5 min final extension at 72°C. Negative

controls were included for each set of PCR. PCR products were separated on a 1.0% agarose gel with GelRed 10× (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and visualised with ultraviolet light. Band intensities were analysed by densitometry using the freeware ImageJ 1.37 for Windows. The *α-tubulin* gene was used for normalisation and all PCR products were run in a single gel. The results expressed were representative of at least three independent experiments (different cultures).

#### *Analysis of extracellular ATP metabolism by high performance liquid chromatography (HPLC)*

After the incubation period on the serum limitation condition, *T. vaginalis* trophozoites were harvested and washed three times with 0.9% (w/v) NaCl solution. Parasites suspensions were diluted to a final protein concentration of approximately 0.6 mg/ml (30236 isolate) and 0.4 mg/ml (LACH1 isolate). The total protein content was measured by the Coomassie Blue method. Intact organisms were added to the reaction mixture (50 mM Tris buffer, pH 7.2, and 5.0 mM CaCl<sub>2</sub>) and the reaction was started by the addition of 0.5 mM ATP (final concentration), at 37°C. After the incubation time (0, 5, 10, 30, 60 and 90 minutes), the reaction was stopped on ice. The incubation medium was centrifuged at 11000 x g for 10 minutes. Aliquots of 20 µl were injected in the chromatographic system (LC-20AT Prominence Liquid Chromatograph, Shimadzu) and data were acquired by LC Solution Software (Shimadzu). The chromatographic separation was performed in a Luna C18(2) (150 mm×4.6 mm, 3 µm, Phenomenex, Torrance, CA) column with a pre-column (4.0 mm×3.0 mm, 3 µm) using 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 40 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.0) as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B. Buffer solutions were filtered through a 0.45 µm membrane pore (Millipore, Bedford, USA). Mobile phase was eluted at a flow rate of 0.8 ml/min following the gradient proposed by Vallé, M. *et al.* (1998). The analyte was detected at 260 nm. All peaks were identified by retention time and by comparison with standards. Controls to correct the non-enzymatic hydrolysis of nucleotides were performed by measuring the peaks present into the same reaction

medium incubated without trophozoites. The controls for cellular purine secretion were performed by incubating the parasites without substrate under the same conditions described above. The results are representative of two independent experiments (different cultures).

#### *Cell cycle analysis by flow cytometry*

For flow cytometry analysis both isolates were maintained on TYM medium supplemented with 1.0% (v/v) HIBS for 2 hours to allow a comparison of the cell cycle between the isolates. An inoculum of  $5.0 \times 10^5$  trophozoites/ml was incubated on serum limitation condition, or not, and harvested and washed 3X with PBS. Cells were then fixed with 70% cold ethanol at 4°C for 45 min. Trophozoites were then incubated with 100 µg/ml RNase A at 37°C for 15 min and then stained with 50 µg/ml propidium iodide (PI; Sigma) at room temperature for 30 min, and kept away from light. The cell cycle was measured with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences), with the acquisition of 50000 events, and analysed by FlowJo software (Tree Star). The results are representative of at least three independent experiments (different cultures).

#### *Statistical Analysis*

Statistical analysis was conducted by Student's *t* test, considering a level of significance of 5%.

## **RESULTS**

We have evaluated the effect of a serum limitation condition on ATP, ADP and AMP hydrolysis in *T. vaginalis* trophozoites. Cellular integrity and viability were assessed by the motility and viability of the trophozoites through trypan blue exclusion before and after the enzymatic assays. The integrity of the trophozoites was not affected by any of the conditions. Furthermore, in order to investigate the effects of serum bovine limitation on *T. vaginalis* growth and morphology, kinetic growth experiments were performed. The Fig. 1 shows that *in vitro* growth of trichomonads

was affected by serum limitation (1.0% HIBS) when compared with control cultures (10% HIBS). The viability of 30236 isolate decreased 55% (Fig. 1A) and the live parasites demonstrated reduced motility and a round aspect after 4 hours under serum limitation condition. The growth of LACH1 isolate remained similar to control until 24 hours of incubation, showing significant reduction after this time (Fig. 1B). Concerned to maintain the trophozoites integrity and based on these findings, we have chosen 2 and 24 hours for 30236 and LACH1 isolates, respectively, for following incubations.

The effect caused by bovine serum limitation on NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities was evaluated. The condition tested promoted significant increase of hydrolysis rates on both isolates, as observed in Fig. 2. The 30236 isolate showed higher enzymatic activation, reaching increases of 154.4%, 176.1% and 302.5% on the hydrolysis of ATP, ADP and AMP, respectively, when compared with control cultures (Fig. 2A). In the clinical isolate, LACH1, the rises corresponded to 14.4%, 22.5% and 162.5% (Fig. 2B). Higher hydrolysis of AMP was observed on both isolates when compared with the nucleosides tri- and diphosphates. Furthermore, the clinical isolate (LACH1) displayed higher enzymatic activities than the representative long-term-grown isolate (ATCC 30236).

Semiquantitative RT-PCR experiments were performed to verify the bovine serum limitation could influence the gene expression of enzymes responsible for extracellular nucleotides hydrolysis. To investigate effects on NTPDase transcriptional control, we evaluated the gene expression through two NTPDase sequences obtained from *T. vaginalis* genome (A: 434 amino acids long and B: 441 amino acids long), which contain the five characteristic apyrase conserved regions (ACRs) of the NTPDase family. The comparison in different experimental conditions was performed by band densitometry using enzyme/ $\alpha$ -tubulin ratios. The results showed that the condition tested alters NTPDases A and B transcript levels in *T. vaginalis* (Fig. 3). For 30236 isolate, it was observed an increase on the expression of NTPDase A, when compared with control culture. However, this effect did not arise on NTPDase B expression, where NTPDase/ $\alpha$ -tubulin rate was not altered (Fig. 3A). For LACH1

isolate, the serum limitation promoted higher gene expression levels of both NTPDase A and B enzymes (Fig. 3B).

In order to a better understanding of extracellular adenine nucleotides hydrolysis, we investigated the pattern for ATP metabolism in *T. vaginalis* trophozoites after HIBS limitation, by HPLC assays over a period of 90 min. Analysing 30236 isolate (Fig. 4), we observed that the ATP consumption was faster in the test culture (Fig. 4C) when compared with control (Fig. 4A), revealing agreement with the increase in ATP hydrolysis (Fig. 2A). ATP concentration decrease was followed by a higher formation of ADP and AMP in trophozoites maintained with 1.0% HIBS that in those grown on 10% serum. On the other hand, adenosine concentration showed a distinct profile: in the control culture the nucleoside was completely consumed in the first 30 minutes being accumulated after this period (Fig. 4B); in the treated trophozoites the adenosine is fully consumed over 90 minutes (Fig. 4D), suggesting that the parasites maintained in 1.0% HIBS exhibited higher adenosine dependence than the control culture.

The Fig. 5 shows the adenine nucleotides metabolism in LACH1 isolate. In the control culture, ATP is moderately metabolised with subsequent ADP and AMP formation (Fig. 5A). Adenosine was produced in the first 10 minutes and consumed in the next analysed times (Fig. 5B). In the tests, we observed that ATP hydrolysis started in the first minutes and the compound was increasingly consumed over the time, thus, the products of enzymatic reaction, ADP and AMP, were highly formed (Fig. 5C). Adenosine formation, the last step of the extracellular ATP cascade, is initially produced and subsequently consumed until it reaches zero level of concentration (Fig. 5D).

Taking into account that in several cell types the serum deprivation may alter the cell cycle (Chou and Langan, 2003; Gos *et al.* 2005; Krzeminski *et al.* 2007) and increase the pool of adenine nucleotides (Rapaport and Zamecnik, 1978), we investigated the effect of HIBS limitation on *T. vaginalis* cell cycle. The results showed that serum limitation condition caused an arrest on *T. vaginalis* cell cycle. Regarding the 30236 isolate, the percentage of G0/G1, S and G2 stages changed from

26.49%, 50.79% and 22.58% to 52.51%, 30.69% and 16.28%, respectively (Fig. 6). Likewise, in LACH1 parasites our data indicated a significant arrest in cell cycle at G0/G1 phase (45.69 to 67.13%). At S and G2 stages the percentage changed from 36.32% and 21% to 20.89% and 13.59%, respectively (Fig. 6).

## DISCUSSION

The current report showed, for the first time, the influence of bovine serum limitation on extracellular nucleotide hydrolysis and metabolism, and on enzyme gene expression in *T. vaginalis* trophozoites. When comparing the incubation of both isolates in a medium with 1.0% serum, the ATCC 30236 isolate (long-term-grown parasites) demonstrated pronounced sensitivity to the stressful condition. After few hours, the trophozoites showed rounded shape, internalised flagella, low motility and growth decrease. However, LACH1, a fresh clinical isolate, maintained its morphology intact, remaining viable and exhibiting a normal growth for 24 hours of incubation. These differences are probably due to the heterogeneity among long-term-grown and fresh clinical isolates, which results in different kinetic growth profiles and sensitivities to serum limitation. The adaptability of *T. vaginalis* to challenging environmental pressures may be explained by the fact that trichomonads possess signal transduction pathways that link changes in the environment with appropriate changes in transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms (Lehker and Alderete, 2000). Furthermore, virulence factors of *T. vaginalis* fresh clinical isolates, such as adhesion to epithelial cells, morphologic transformation, cytotoxicity and phagocytosis, are strongly reduced when parasites are submitted to continuous and prolonged *in vitro* culture (Arroyo *et al.* 1992; Gilbert *et al.* 2000; Cuervo *et al.* 2008). These data support differences among isolates and explain the distinct serum limitation susceptibility profiles observed.

Our results demonstrated that bovine serum limitation promoted a significant increase on extracellular ATP, ADP and AMP hydrolysis. NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities were enhanced and AMP hydrolysis rate was higher than the other nucleotides for both isolates. This outstanding increase on AMP hydrolysis, which is the step in the enzymatic chain responsible for the production of adenosine, corresponds to our working hypothesis that proposed an activation of ectonucleotidases in an environment with reduced serum concentration. Gottlieb, M. (1985) showed that the levels of 3'- and 5'- nucleotidase activities in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata* was regulated by the availability of adenosine on the culture medium. Specifically, organisms obtained from purine depleted culture medium contained elevated levels of enzymes activities compared to those grown on complete medium. Our findings corroborate with these previous data and strongly suggest that the enzymes play a fundamental role on the adenosine generation, which is essential for the growth and metabolism of the parasites (Munagala and Wang, 2003). In accordance with prior studies (Tasca *et al.* 2005), extracellular ATP, ADP, and AMP hydrolysis in *T. vaginalis* were higher in fresh clinical isolates when compared to a representative long-term-grown isolate. The pattern of extracellular nucleotides metabolism showed that serum-deprived cultures have higher ability to hydrolyse ATP, leading to an increase in the formation of intermediates such as ADP and AMP. These data are consistent with the results found on the enzyme activity assay, demonstrating that the trophozoites under this condition are more dependent on the functions performed by ectonucleotidases. In 30236 isolate, the adenosine profile showed that there was an accumulation of the nucleoside in the untreated control, unlike the parasites grown in 1.0% serum where total consumption occurred. Based on these findings we can assume that under the nutrient limitation condition *T. vaginalis* trophozoites were capable to use the adenosine generated from the ectonucleotidases cascade probably through uptake by the purine salvage pathways to maintain its growth and viability. The profile observed in the control culture reflected the nucleoside accumulation promoted by the high availability of adenosine on the medium and also by the enzymatic production. In LACH1 isolate there was no

difference on the adenosine HPLC profile, and both conditions (treated and untreated) showed similar metabolism over the incubation period, occurring absolute nucleoside consumption after one hour. These evidence corroborate with the idea of heterogeneity among isolates and demonstrate the existence of several profiles between fresh clinical and long-term-grown *T. vaginalis* trophozoites. We hypothesised that low concentrations of adenosine observed in Fig. 4 and 5, and the nucleoside disappearance after a certain period might occur due to rapid adenosine uptake. Harris, D.I. *et al.* (1988) demonstrated that adenosine is rapidly reuptake by trophozoites of *T. vaginalis* within 100 seconds. Moreover, adenosine is transported at a rate marginally more rapid than guanosine but substantially more rapid than uridine. Interestingly in Harris' study, after 10 seconds, about 75% of adenosine recovered was in the nucleotide fraction, principally as ADP and ATP. In this context, further studies are still required in order to clarify the pathway followed by adenosine produced by ATP metabolism, under a condition of serum limitation.

RT-PCR analysis demonstrated that serum reduction promoted an increase on the relative gene expression of NTPDase A and B for both isolates. Higher mRNA levels were observed in LACH1 than in the 30236. This difference may be attributed to the time that the cultures were exposed to the condition test: while the trophozoites of the clinical isolate (LACH1) were maintained for 24 hours on a medium with 1.0% serum, the 30236 isolate remained for only 2 hours under the same condition. This short time of incubation could reflect in lack of evident upregulation on gene expression. Clearly, our results showed that serum deprivation was also able to regulate the transcriptional activity of NTPDase in *T. vaginalis*.

In the trichomonads cultivation, the serum added to the medium is extremely important for trophozoites growth maintenance. The major role of serum is to supply lipids, in particular fatty acids and cholesterol, in a form that can be assimilated by the organism without toxicity (Linstead, 1990). However, besides these compounds, the serum also provides other molecules essential for the parasites, including precursors of purine and pyrimidine nucleotides (Wang *et al.* 1984). Therefore, serum may be considered a source of the nucleoside adenosine where the concentration can reach



around 0.3-0.6  $\mu\text{M}$  (Rapaport and Zamecnik, 1978; Haskó and Cronstein, 2004). Once uptake, this compound will be employed on nucleic acid synthesis, ATP generation and intracellular signaling and the ectonucleotidases represent an efficient pathway to acquire adenosine. Considering that *T. vaginalis* lacks *de novo* purine synthesis, these enzymes play an important role in adenosine production, necessary for the survival of the parasite (Munagala and Wang, 2003).

In this study, the serum limitation promoted an activation on NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities, indicating that under this condition the enzymes are recruited to produce even more adenosine to follow uptake by purine salvage pathways. In the same direction, previous studies showed that in serum-deprived mammalian cells the incorporation of adenosine into ATP and ADP pools is markedly increased (Rapaport and Zamecnik, 1978; Albert and Gudast, 1985). Importantly, serum deprivation is a well established process that promotes cell cycle arrest at G0/G1 stage in several cell types (Kues *et al.* 2000; Cooper, 2003), as evidenced in this present work. Thus, according with Rapaport, E. and Zamecnik, P.C. (1978), the high adenosine incorporation into the nucleotide pools promoted by serum limitation may act as a signal mediating the intracellular response to environmental changes that detain cellular proliferation.

In summary, the present report contributes towards the demonstration of the important role of ectonucleotidases, specifically NTPDase and ecto-5'-nucleotidase, in adenosine production when *T. vaginalis* trophozoites were exposed to a condition of serum limitation. Furthermore, our results emphasise the relevance of the enzymatic pathway that breaks down ATP and provides adenosine for parasite growth, supporting the establishment of infection. Future investigations including interference RNA (RNAi) approaches will contribute to understand the role of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in *T. vaginalis* biology as well as their potential as pharmacological targets.

## **FINANCIAL SUPPORT**

A.P.F. is recipient of fellowship from CNPq; D.B.R. from CAPES; and M.F.C from CAPES/REUNI. This study received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) grant #477348/2008-4 awarded to T.T., and from the NANOBIOTEC-Brazil program from CAPES (Brazil).

## REFERENCES

- Albert, D.A. and Gudast, L.J.** (1985). Ribonucleotide reductase activity and deoxyribonucleoside triphosphate metabolism during the cell cycle of S49 wild-type and mutant mouse T-lymphoma cells. *The Journal of Biological Chemistry* **26**, 679-684.
- Arroyo, R., Engbring, J. and Alderete, J.F.** (1992). Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology* **6**, 853–862. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01536.x.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 218-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Burnstock, G.** (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews* **87**, 659-797. doi: 10.1152/physrev.00043.2006.
- Carlton, J.M., Hirt, R.P., Silva, J.C., Delcher, A.L., Schatz, M., Zhao, Q, et al.** (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* **315**, 207-212. doi: 10.1126/science.1132894.
- Chan, K.M., Delfert, D. and Junger, K.D.** (1986). A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. *Analytical Biochemistry* **157**, 375-380. doi: 10.1016/0003-2697(86)90640-8.
- Cherpes, T., Wiesenfeld, H., Melan, M., Kant, J.A., Consentino, L.A., Meyn, L.A. and Hillier, S.L.** (2006). The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sexually Transmitted Diseases* **33**, 747–752. doi: 10.1097/01.olq.0000218869.52753.c7.
- Cooper, S.** (2003). Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G0, and G1 phase arrest points. *The FASEB Journal*. **17**, 333-340. doi: 10.1096/fj.02-0352rev.

- Chan, K.M., Delfert, D. and Junger, K.D.** (1986). A direct colorimetric assay for  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated ATPase activity. *Analytical Biochemistry* **157**, 375-380. doi: 10.1016/0003-2697(86)90640-8.
- Cotch, M.F., Pastorek, J.G., Nugent, R.P., Hillier, S.L., Gibbs, R.S., Martin, D.H., Eschenbach, D.A., Eldeman, R., Carey, J.C., Regan, J.A., Krohn, M.A., Klebanoff, M.A., Rao, A.V. and Rhoads, G.G.** (1997). *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Sexually Transmitted Diseases* **24**, 353-360. doi: 10.1097/00007435-199707000-00008.
- Chou, R.C. and Langan, T.J.** (2003). *In vitro* synchronization of mammalian astrocytic cultures by serum deprivation. *Brain Research Protocols* **11**, 162-167. doi: 10.1016/S1385-299X(03)00043-6.
- Cuervo, P., Cupolillo, E., Britto, C., González, L.J., E, Silva-Filho.F.C., Lopes, L.C., Domont, G.B. and De Jesus, J.B.** (2008). Differential soluble protein expression between *Trichomonas vaginalis* isolates exhibiting low and high virulence phenotypes. *Journal of Proteomics* **71**, 109-122. doi: 10.1016/j.jprot.2008.01.010.
- Diamond, L.S.** (1957). The establishment of various *Trichomonas* of animals and man in axenic cultures. *The Journal of Parasitology* **43**, 488-490.
- Harris, D.I., Beechey, R.B., Linstead, D. and Barret, J.** (1988). Nucleoside uptake by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **29**, 105-116. doi:10.1016/0166-6851(88)90065-5.
- Haskó, G. and Cronstein, B.N.** (2004). Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*. **25**, 33-39. doi: 10.1016/j.it.2003.11.003.
- Heyworth, P.G., Gutteridge, W.E. and Ginger, C.D.** (1982). Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters* **14**, 106-110. doi:10.1016/0014-5793(82)80026-4.
- Gilbert, R.O., Elia, G., Beach, D.H., Klaessig, S. and Singh, B.N.** (2000). Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial

cells cultured *in vitro*. *Infection and Immunity* **68**, 4200–4206. doi: 10.1128/IAI.68.7.4200-4206.2000.

**Giordani, R.B., Weizenmann, M., Rosemberg, D.B., De Carli, G.A., Bogo, M.R., Zuanazzi, J.A. and T, T.** (2010). *Trichomonas vaginalis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine. *Parasitology International* **59**, 226-231. doi: 10.1016/j.parint.2010.02.004.

**Goldstein, F., Goldman, M.B. and Cramer, D.W.** (1993). Relation of tubal infertility to story of sexually transmitted diseases. *American Journal of Epidemiology* **137**, 577-584.

**Gos, M., Miloszevska, J., Swoboda, P., Trembacz, H., Skierski, J. and Janik, P.** (2005). Cellular quiescence induced by contact inhibition or serum withdrawal in C3H10T1/2 cells. *Cell Proliferation* **38**, 107-116. doi: 10.1111/j.1365-2184.2005.00334.x.

**Gottlieb, M.** (1985). Enzyme regulation in a trypanosomatid: effect of purine starvation on levels of 3'-nucleotidase activity. *Science* **227**, 72-74. doi: 10.1126/science.2981117.

**Johnston, V.J. and Mabey, D.C.** (2008). Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases* **21**, 56–64. doi: 10.1097/QCO.0b013e3282f3d999.

**Krzeminski, P., Suplat, D., Czajkowski, R., Pomorski, P. and Baranska, P.** (2007). Expression and functional characterization of P2Y1 and P2Y12 nucleotide receptors in long-term serum-deprived glioma C6 cells. *FEBS Journal* **274**, 1970–1982. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05741.x.

**Kucknoor, A.S., Mundodi, V. and Alderete, J.F.** (2000). Heterologous expression in *Tritrichomonas foetus* of functional *Trichomonas vaginalis* AP65 adhesin. *BMC Molecular Biology* **6**,5. doi: 10.1186/1471-2199-6-5.

**Kues, W.A., Anger, M., Carnwath, J.W., Paul, D., Motlik, J. and Niemann, H.** (2000). Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: Effects of serum

deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biology of Reproduction* **62**, 412–419. doi: 10.1095/biolreprod62.2.412.

**Lehker, M.W. and Alderete, J.F.** (2000). Biology of trichomonosis. *Current Opinion in Infectious Diseases* **13**, 37-45.

**Linstead, D.** (1990). Cultivation. In *Trichomonads Parasitic in Humans* (ed. Honigberg, B.M.), pp. 05-35. Springer, New York.

**Matos, J.A.A., Borges, F.P., Tasca, T., Bogo, M.R., De Carli, G.A., Fauth, M.G., Dias, R.D. and Bonan, C.D.** (2003). Characterization of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology* **31**, 770-775. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00191-6.

**Munagala, N.R. and Wang, C.C.** (2003). Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **127**, 143-149. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00330-4.

**Pereira-Neves, A. and Benchimol, M.** (2007). Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biology of the Cell* **99**, 87-101. doi:10.1042/BC20060084.

**Rapaport, E. and Zamecnik, P.C.** (1978). Increased incorporation of adenosine into adenosine nucleotide pools in serum-deprived mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America* **75**, 1145-1147.

**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. and Bonan, C.D.** (2010). *Trichomonas vaginalis*: dehydroepiandrosterone sulfate and 17beta-estradiol alter NTPDase activity and gene expression. *Experimental Parasitology* **125**, 187-195. doi: 10.1016/j.exppara.2010.01.029.

**Robson, S.C., Sévigny, J. and Zimmermann, H.** (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* **2**, 409-430. doi: 10.1007/s11302-006-9003-5.

- Sansom, F.M., Robson, S.C. and Hartland, E.L.** (2008). Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**, 765-781. doi: 10.1128/MMBR.00013-08.
- Tasca, T., Bonan, C.D., De Carli, G.A., Battastini, A.M.O. and Sarkis, J.J.F.** (2003). Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Parasitology* **105**, 167–173. doi: [10.1016/j.exppara.2003.12.001](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2003.12.001).
- Tasca, T., Bonan, C.D., De Carli, G.A., Sarkis, J.J. and Alderete, J.F.** (2005). Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*, **131** (Pt 1) 71-78. doi: 10.1017/S0031182005007377.
- Van Der Pol, B., Kwok, C., Pierre-Louis, B., Rinaldi, A., Salata, R.A., Chen, P.L., Van De Wijgert, J., Miro, F., Mugerwa, R., Chipato, T. and Morrison, C.S.** (2008). *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *The Journal of Infectious Diseases* **197**, 548–554. doi: 10.1086/526496.
- Vallé, M., Malle, P. and Bouquelet, S.** (1998). Evaluation of fish decomposition by liquid chromatographic assay of ATP degradation products. *Journal of AOAC International* **81**, 571-575.
- Viikki, M., Pukkala, E., Nieminen, P. and Hakama, M.** (2000). Gynecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncologica (Madri)* **39**, 71–75. doi: 10.1080/028418600431003.
- Wang, C.C., Wang, A.L. and Rice, A.** (1984). *Tritrichomonas foetus*: Partly defined cultivation medium for study of the purine and pyrimidine metabolism. *Experimental Parasitology* **57**, 68-75. doi: 10.1016/0014-4894(84)90064-X.
- World Health Organization** (2001). *Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. Overview and Estimates*. World Health Organization, Geneva.

- Yegutkin, G.G.** (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta* **1783**, 673-694. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.024.
- Zimmermann, H.** (2001). Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research* **52**, 44-56. doi: 10.1002/ddr.1097.



**Table 1.** PCR primer design

<b>Enzyme</b>	<b>Primer sequences (5' → 3')</b>	<b>Annealing temperature (°C)</b>	<b>PCR product (bp)</b>	<b>GenBank accession number (mRNA)</b>
<b>NTPDase A</b>	<b>F</b> -TGAAGAAGAGTTGAAGGGCAAAG <b>R</b> -AATTCTTCGACAGGAGGCATTG	53	342	XM_001298945
<b>NTPDase B</b>	<b>F</b> -CGACTACATCATCTCTTGCCGATC <b>R</b> -GACTCTCTTATGTATCTTTGGGCAG	53	397	XM_001579653
<b><math>\alpha</math>-Tubulin</b>	<b>F</b> -GCCAACATGATGGTTAAGTGCGATCCAC <b>R</b> -CAGCTTCTCCATACCCTCACCGACG	61	355	XM_001330630

## Captions to Figures

**Fig. 1.** Effect of bovine serum limitation (1.0% HIBS) on *T. vaginalis* kinetic growth curve. (A) Effect of an initial inoculum at  $1.0 \times 10^5$  trophozoites/ml in long-term-grown isolate (ATCC 30236), showing an important growth reduction in the first hours when trichomonads were cultivated on 1.0% HIBS; (B) For the clinical isolate (LACH1), the growth remained similar to control until 24 hours of incubation. Bars represent the mean $\pm$ S.D. of at least three experiments, each in triplicate.

**Fig. 2.** Effect of bovine serum limitation (1.0% HIBS) on NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in *T. vaginalis*. (A) Serum limitation promoted a significant increase of ATP, ADP and AMP hydrolysis in ATCC 30236 and (B) LACH1 isolate. Bars represent the mean $\pm$ S.D. of at least three experiments, each in triplicate. Asterisk (\*) indicates significant difference from controls by the Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ).

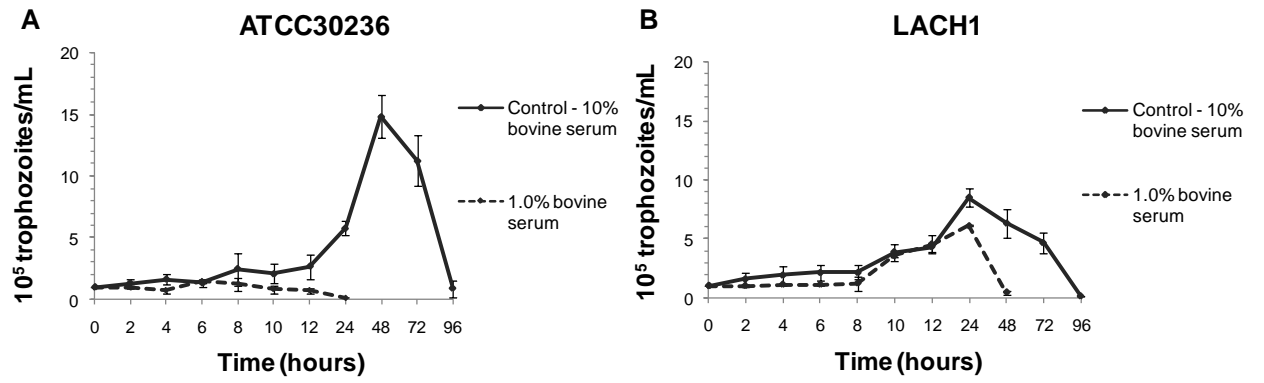
**Fig. 3.** Gene expression patterns of NTPDase members after bovine serum limitation (1.0% HIBS). (A) On ATCC 30236 was observed only an increase on the expression of NTPDase A; (B) For LACH1 isolate, the serum limitation promoted higher gene expression levels of both NTPDase A and B enzymes. Bars represent the mean $\pm$ S.D. of at least three experiments. Asterisk (\*) indicates significant difference from controls by the Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ).

**Fig. 4.** ATP hydrolysis and product formation by *T. vaginalis* (ATCC 30236) after bovine serum limitation (1.0% HIBS). (A) Control (10% HIBS) and (B) Amplification of adenosine formation; (C) Cells maintained on 1.0% HIBS and (D) Amplification of adenosine formation. Bars represent the mean $\pm$ S.D. of at least two experiments.

**Fig. 5.** ATP hydrolysis and product formation by *T. vaginalis* (LACH1) after bovine serum limitation (1.0% HIBS). (A) Control (10% HIBS) and (B) Amplification of adenosine formation; (C) Cells maintained on 1.0% HIBS and (D) Amplification of adenosine generation. Bars represent the mean $\pm$ S.D. of at least two experiments.

**Fig. 6.** Effect of bovine serum limitation (1.0% HIBS) on cell cycle stages in *T. vaginalis*. The cell cycle arrest at G0/G1 phase was observed for the ATCC 30236 and LACH1 isolates, after serum limitation. Control is represented by gray lines (—) and test by black lines (—). The data are representative of at least three independent experiments.

Figure 1



**Figure 2**

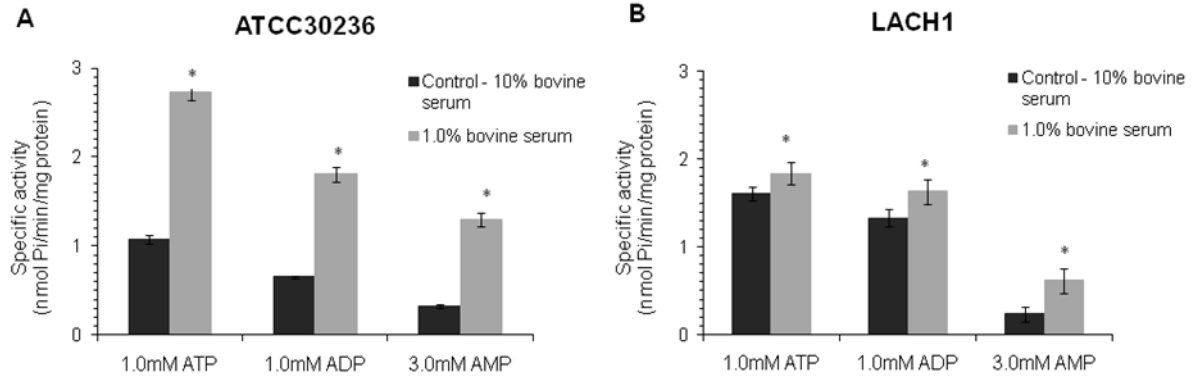


Figure 3

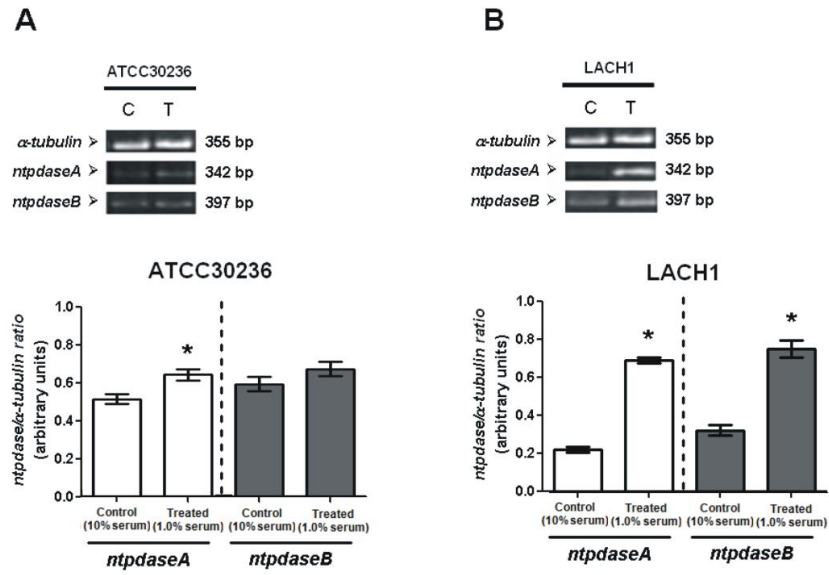


Figure 4

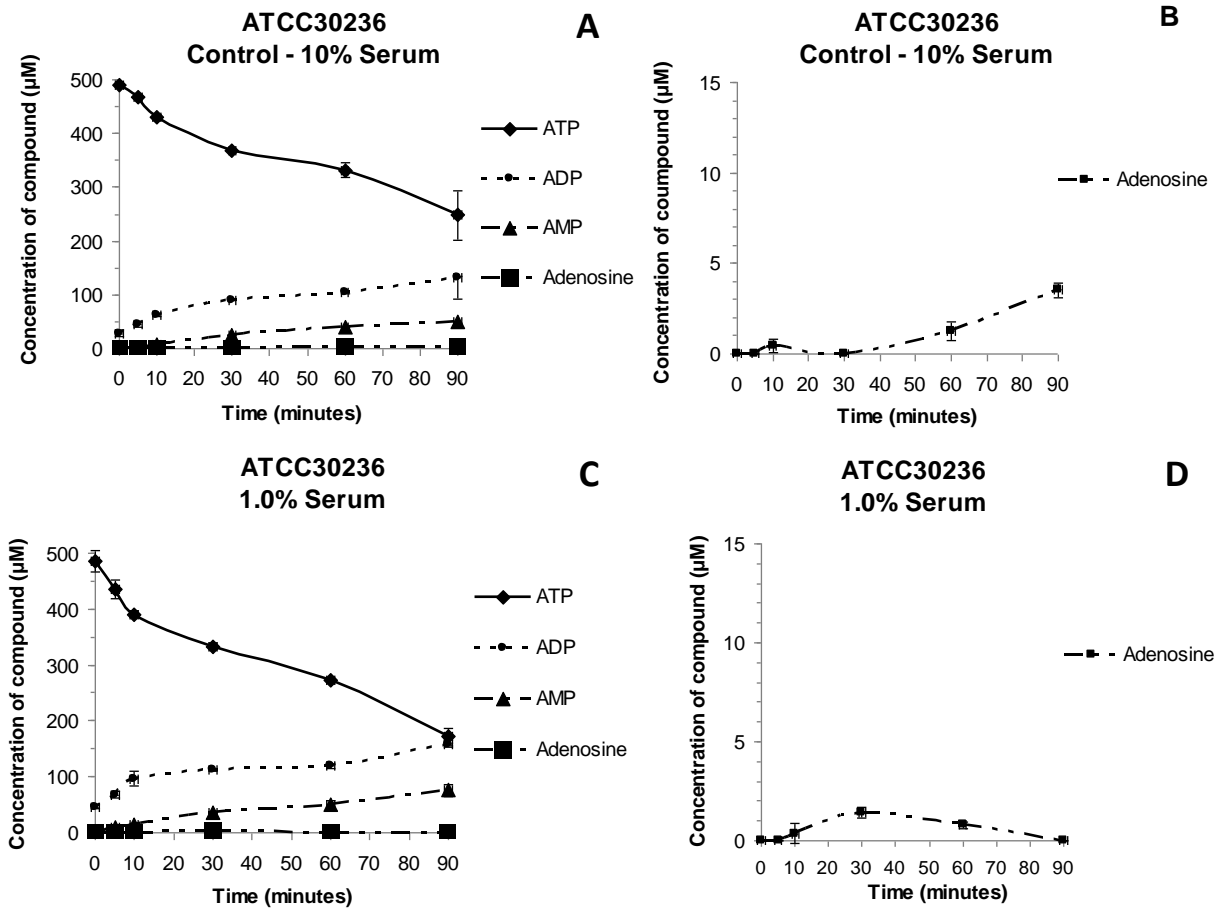
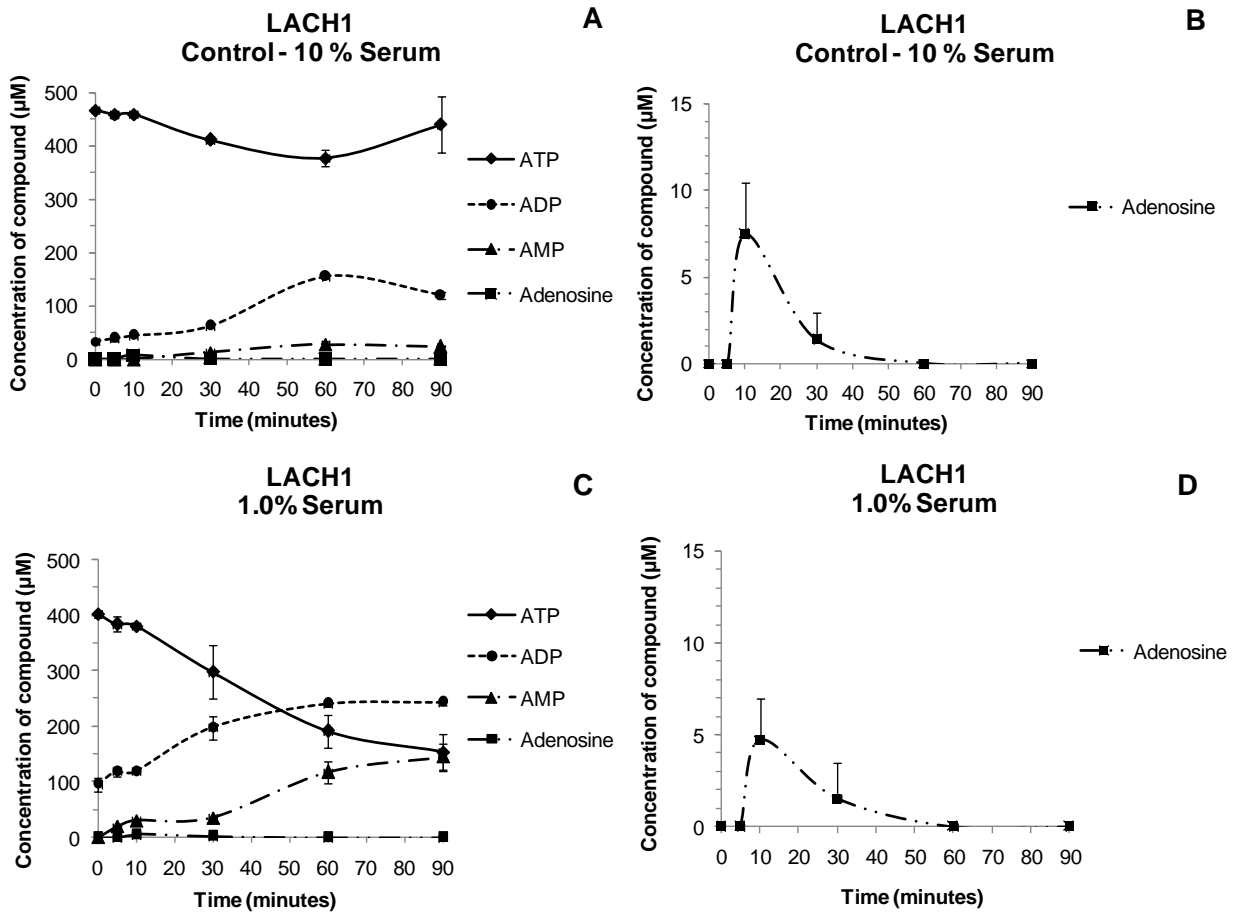
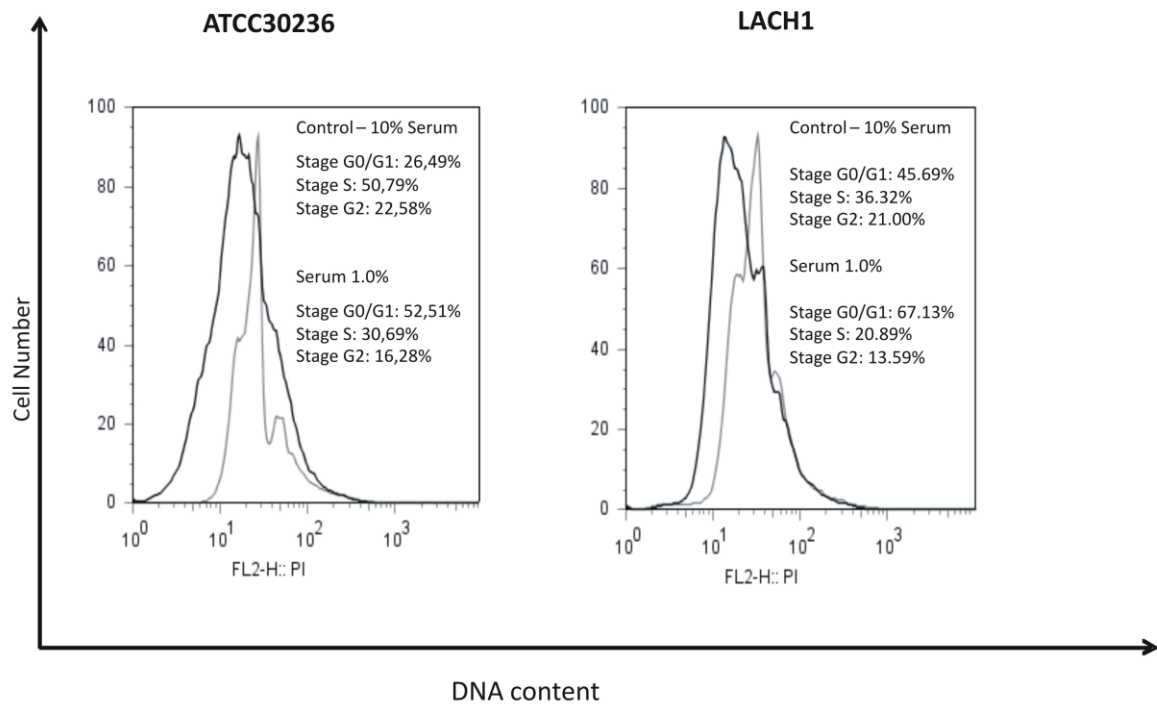


Figure 5





**Figure 6**





II.2. CAPÍTULO 2 – Amanda Piccoli Frasson, Geraldo Attilio De Carli, Carla Denise Bonan, Tiana Tasca. Involvement of purinergic signalling on nitric oxide production by neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. **Purinergic Signalling** (submetido).

**Involvement of purinergic signalling on nitric oxide production by neutrophils  
stimulated with *Trichomonas vaginalis***

Amanda Piccoli Frasson<sup>a</sup>, Geraldo Attilio De Carli<sup>b</sup>, Carla Denise Bonan<sup>c</sup>,  
Tiana Tasca<sup>a\*</sup>

- a. Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.
- b. Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.
- c. Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

**\* Corresponding Author (Tiana Tasca)**

Tel.: +55-51-3308-5325; fax: +55-51-3308-5437.

*E-mail address:* tiana.tasca@ufrgs.br

## Abstract

*Trichomonas vaginalis* is a parasite from the human urogenital tract that causes trichomonosis, the most prevalent non-viral sexually transmitted disease. The neutrophil infiltration has been considered to be primarily responsible for cytological changes observed at infection site, and the chemoattractants can play an important role in this leukocytic recruitment. Nitric oxide (NO) is one of the most widespread mediator compounds and it is implicated in modulation of immunological mechanisms. Extracellular nucleotides and nucleosides are signalling molecules involved in several processes, including immune responses and control of leukocyte trafficking. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) members, ecto-5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ectoADA) have been characterized in *T. vaginalis*. Herein we investigated the effects of purinergic system on NO production by neutrophils stimulated with *T. vaginalis*. The trophozoites were able to induce a high NO synthesis by neutrophils through iNOS pathway. The extracellular nucleotides ATP, ADP, and a non-hydrolyzable ATP analog showed no significant change in NO secretion. In contrast, adenosine and its degradation product, inosine, promoted a low production of the compound. The immunosuppressive effect of adenosine upon NO release by neutrophils occurred due to A<sub>2A</sub> receptors activation. The ecto-5'-nucleotidase activity displayed by *T. vaginalis* showed to be important in adenosine generation, indicating the efficiency of purinergic cascade. Our data suggest the influence of purinergic signalling, specifically adenosinergic system, on NO production by neutrophils in *T. vaginalis* infection, contributing to the immunological aspects of disease.

**Keywords:** *Trichomonas vaginalis*, neutrophils, nitric oxide, purinergic signalling, ectonucleotidases, adenosine.

## 1. Introduction

*Trichomonas vaginalis* is a flagellated protozoan that causes trichomonosis, the most common non-viral sexually transmitted disease (STD) in humans. There are 160-180 million cases occurring each year worldwide [1]. Trichomonosis has been associated with serious health consequences for women, including adverse pregnancy outcomes [2], infertility [3], predisposition to cervical cancer [4] and pelvic inflammatory disease [5]. The infection among men is a recognized cause of urethritis, and complications such as prostatitis, epididymitis and infertility have been described [6]. Moreover, trichomonosis is a co-factor in human immunodeficiency virus (HIV) transmission and acquisition [7]. Considering all these aspects and the importance of this STD on public health, it is important to investigate biochemical and cellular mechanisms that contribute to host infection and pathogenesis.

In women, *T. vaginalis* causes a wide spectrum of symptoms, ranging from a relatively asymptomatic state to severe inflammation and irritation with foul-smelling vaginal discharge, low abdominal pain, and dysuria [8-9]. Importantly, the infection is often recurrent, with no lasting immunity, suggesting the importance of innate immunity [10]. In this way, neutrophil infiltration has been considered to be primarily responsible for cytological change, but little is known about the exact mechanism of how neutrophils accumulate or mediate the initial inflammatory response after an acute *T. vaginalis* infection [11]. Nevertheless, it is generally believed that chemoattractants, such as interleukin-8 (IL-8), reactive nitrogen intermediates and leukotrienes, generated at reaction sites may have an important role. Previous studies have already demonstrated that the production of IL-8 by neutrophils [12] and monocytes [13] is stimulated in response to *T. vaginalis*. In addition, nitric oxide (NO) is an effector of macrophage-mediated cytotoxicity against the parasite [14], and leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) is a neutrophil-activating factor released by *T. vaginalis* [15]. These molecules are found in the vaginal discharges of symptomatic patients [16] and provide the induction of a rapid accumulation of neutrophils at the affected site in order to eliminate the invading mucosal pathogen [17].

Nucleotides such as ATP, ADP and AMP, and their nucleoside derivative, adenosine, are found in all animal organ systems where they produce effects both by intracellular and extracellular mechanisms [18]. Extracellular nucleotides are signalling molecules involved in several processes, including immune responses and control of leukocyte trafficking between the blood and tissues [19]. ATP's role in immunity is closely related to its breakdown product, the adenosine. The nucleoside has an already established role in immunity, in which it may contribute to the engineering of inflammation and immune responses by providing a suppressive tissue-protecting signal in a delayed, negative feedback manner [20]. The notion of an interrelation between ATP and adenosine is firmly based on the presence of a large family of purinergic receptors (P1 and P2 receptors for adenosine and ATP, respectively) [21]. Ectonucleotidases are a group of ecto-enzymes involved in a purinergic cascade by which extracellular purine levels and the ensuing purinergic signalling can be dynamically controlled during inflammatory and immune responses. These enzymes include the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family, which hydrolyze nucleoside tri- and diphosphates, and the ecto-5'-nucleotidase, which hydrolyzes nucleoside monophosphates [22]. Together, ecto-5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA), another ectoenzyme that is involved in purine salvage pathways and converts adenosine to inosine, closely regulate local, extracellular and plasma concentrations of adenosine [23]. Previous studies from our group have already characterized NTPDase [24], ecto-5'-nucleotidase [25], and ecto-ADA (unpublished data) activities in trophozoites of *T. vaginalis*.

In this sense, considering (i) the importance of purinergic signalling on immune responses, and (ii) the necessity to elucidate how neutrophils mediate the initial inflammatory response in trichomonosis, the present study investigated the involvement of purinergic signalling through ectonucleotidases, nucleotides, nucleoside and purinoceptors, on NO production by neutrophils stimulated with *T. vaginalis*.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Chemicals

Lipopolysaccharide (LPS), nucleotides (ATP, ADP, AMP), adenosine 5'-(3-thiotriphosphate) tetralithium salt (ATP $\gamma$ S), adenosine, inosine, erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine (EHNA),  $\alpha,\beta$ -methylene adenosine diphosphate (AMPCP), N<sup>G</sup>-Methyl-L-arginine acetate salt (L-NMMA), CGS21680 and caffeine were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

### 2.2 Culture of *T. vaginalis*

*T. vaginalis* isolates, 30236 (from the American Type Culture Collection) and TVLACM2, a fresh clinical isolate (from Laboratório de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Brazil), were used in this study. Trichomonads were cultured axenically *in vitro* on trypticase–yeast extract–maltose (TYM) medium, (pH 6.0), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated bovine serum, and incubated at 37°C ( $\pm 0.5$ ) [26]. Organisms in the logarithmic phase of growth exhibiting motility and normal morphology were harvested, centrifuged, washed three times with phosphate buffered saline 1x (PBS) and resuspended on new TYM medium for the experiments.

### 2.3 Enzyme assays

Trophozoites were harvested and washed three times with 0.9% (w/v) NaCl solution, and the viability was checked using trypan blue (0.2%) dye exclusion. The parasites suspension was diluted to a final protein concentration of approximately 0.6 mg/mL (for both isolates) to ensure linearity in the enzyme assays. Protein was measured by the Coomassie Blue method [27], using bovine serum albumin as standard.

Intact organisms were added to the NTPDase reaction mixture (50 mM Tris buffer, pH 7.2, and 5.0 mM CaCl<sub>2</sub>) for measuring ATP and ADP hydrolysis (Matos et al. 2001). The same density of parasites was added to the ecto-5'-nucleotidase reaction



mixture (50 mM Tris buffer, pH 7.5, and 3 mM MgCl<sub>2</sub>) (Tasca et al. 2003). The samples were preincubated for 5 min at 37 °C in 200 µL of the reaction mixture. The reaction started with the addition of substrates: ATP and ADP (final concentration 1.0 mM), for NTPDase assay, and AMP (final concentration 3.0 mM), for ecto-5'-nucleotidase assay. The reaction was terminated by adding 200 µL of 10% (v/v) trichloroacetic acid (TCA). The samples were chilled on ice for 10 min before the release of inorganic phosphate (Pi) measurement [28]. Controls included intact organisms added to the reaction mixtures containing TCA in order to correct non-enzymatic hydrolysis of substrates, and the averages of control values were subtracted from the test samples. Specific activity was expressed as nmol Pi released/min/mg of protein. All samples were run in triplicate at least in three independent experiments.

#### *2.4 Isolation of human neutrophils*

Human neutrophils were isolated as previously described [29], with some modifications. Briefly, venous blood of healthy volunteers was collected on heparin anticoagulant solution, centrifuged (250g, 10 minutes, 24°C), and the resulting platelet-rich plasma discarded. Leukocytes were obtained following erythrocyte sedimentation in 2% Dextran T-500 and centrifuged (525g, 20 minutes, 24°C) through a layering on Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA). The neutrophil-enriched pellet was subjected to a 15 seconds hypotonic lysis to remove the remaining erythrocytes and centrifuged (1000g, 5 minutes, 24°C). The purified neutrophils were resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and 10mM HEPES for the next experiments. The purity of neutrophils was confirmed morphologically (>95%) and examined by flow cytometry (FACSCalibur, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA). The phenotypic analysis were realized by Cell Quest BD and Paint a Gate Pro BD softwares, after staining with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD45, anti-CD15, anti-CD8 antibodies and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD14, anti-CD22, anti-CD3 and anti-CD4 antibodies (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA).

### 2.5 Culture condition of neutrophils and *T. vaginalis*

Neutrophils ( $2.0 \times 10^5$ ) were cocultured with live trophozoites ( $1.0 \times 10^4$ ) on 96-well microplate, for 24 hours, in presence or not of 100 ng/ml LPS (used as positive control), 100  $\mu$ M nucleotides (ATP, ADP, AMP), 100  $\mu$ M ATP $\gamma$ S (a non-hydrolyzable ATP analog), 100  $\mu$ M adenosine, 100  $\mu$ M inosine, and ecto-5'-nucleotidase, ADA, inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitors (100  $\mu$ M AMPCP, 50  $\mu$ M EHNA and 200  $\mu$ M L-NMMA, respectively). In addition, 1.0  $\mu$ M CGS21680 and 12.3  $\mu$ M caffeine, A<sub>2A</sub> receptor agonist and antagonist, respectively, were added or not along with neutrophils and *T. vaginalis*. After incubation, the cell-free culture supernatants were collected and subjected to quantification of nitrite immediately. The results are representative of at least three independent experiments.

### 2.6 Measurement of nitrite production

The concentration of NO in culture supernatants was determined as nitrite using Griess reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) in accordance with manufacturer instructions.

### 2.7 Statistical analysis

Data were expressed by mean $\pm$ standard deviation (S.D.) and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple range test or Student's *t* test, considering  $p < 0.05$  as significant. The analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software.

## 3. Results

We have evaluated the effect of purinergic signalling on NO production by human neutrophils stimulated with *T. vaginalis*. The viability of trophozoites and neutrophils were assessed by the motility and trypan blue exclusion dye before the

assays. The cellular integrity was not affected by any of the conditions. Also, as revealed by phenotypic analysis, 93% of the isolated immune cells corresponded to neutrophils (data not show).

The effects of ectonucleotidases and adenine nucleotides/nucleoside on NO production by neutrophils were investigated after stimuli with *T. vaginalis* trophozoites. Fig. 1 shows that neutrophils alone produced low levels of NO ( $1.98\pm 0.35$ ), however, when stimulated with LPS (positive control) the concentration increased more than 18 times ( $36.31\pm 6.57$ ). Similarly and expectedly, the coculture with *T. vaginalis* isolates produced high NO amount. In order to confirm the NO production through iNOS pathway, we have incubated the neutrophils and parasites with L-NMMA, an iNOS inhibitor. The results showed that L-NMMA reversed the anterior effect, demonstrating the iNOS involvement on NO production by neutrophils.

The influence of extracellular nucleotides (ATP and ADP) on NO synthesis can be observed in Fig. 2. The presence of nucleoside tri- and diphosphates showed no significant change in secretion of NO by neutrophils stimulated with both isolates. In the sense to eliminate a possible interference of ATP hydrolysis by enzymatic action, we evaluated the effect of ATP $\gamma$ S, a non-hydrolyzable ATP analog. The substance also did not promote alteration compared to the control (neutrophils and *T. vaginalis*) or to the ATP condition, showing that adenine nucleotides as well as NTPDase, the enzyme responsible for its hydrolysis, are not involved in NO release by *T. vaginalis*-stimulated neutrophils.

Fig. 3 displays the capacity of AMP and the degradation products, adenosine and inosine, in interfering on NO production by neutrophils. The addition of AMP caused a significant decrease in NO levels on 30236 isolate when compared with control or clinical isolate, LACM2. This finding can be justified by the action of ecto-5'-nucleotidase, the enzyme able to hydrolyze AMP. Importantly, while the 30236 isolate presented a specific ecto-5'-nucleotidase activity of  $0.321\pm 0.018$  nmol/Pi/min/mg protein, the LACM2 isolate showed an activity more than seven times lower ( $0.044\pm 0.030$ ) (Table 1). Thus, the 30236 isolate produced higher amounts of adenosine, which could explain the antiinflammatory effect observed by the decrease

on NO production. To verify the action of ecto-5'-nucleotidase, we tested the inhibitor AMPCP and it was observed a reversion of the previous effect, strongly suggesting the involvement of the enzyme in the NO secretion. In same way, the nucleoside adenosine also promoted reduction of NO levels, on both isolates. In addition, the ADA inhibitor, EHNA, and inosine, the product of ADA activity, maintained a low NO production. All together these results indicate that the last step of the enzymatic cascade, with performance of parasite ecto-5'-nucleotidase and ADA, and consequent formation of adenosine and inosine, is able to modulate the NO secretion by neutrophils stimulated with *T. vaginalis*. In addition, to further support the adenosine antiinflammatory effect, we have tested CGS21680 and caffeine, A<sub>2A</sub> receptor agonist and antagonist, respectively. As expected, the NO production by *T. vaginalis*-stimulated neutrophils was inhibited by CGS21680, whereas it was increased by caffeine, indicating the adenosine effect through A<sub>2A</sub> receptor (Fig. 4).

#### **4. Discussion**

To better understand how neutrophils mediate initial immune response against mucosal parasites is important to investigate the mechanisms and pathways involved in the production of chemoattractants. In the same direction, extracellular nucleotides are signalling molecules in inflammatory processes and recent studies have shown that the purinergic system is closely related to the activation and recruitment of neutrophils [30-32]. In this current report, we showed the influence of adenine nucleotides and nucleoside, inosine, ectonucleotidases and purinoceptors on NO production by neutrophils stimulated with *T. vaginalis*.

NO is one of the most widespread signalling molecules in mammals. The compound is implicated in modulating a variety of physiological reactions, including vasodilatation and smooth muscle relaxation associated with the circulation, neurotransmission in a variety of neural processes, and immunological mechanisms. The neutrophil response, fundamental component of the non-specific immune defense, is characterized by adhesion to the vascular endothelium, followed by migration into

tissues, oxygen radical-dependent killing of microorganisms, and elimination of parasites and tissue debris by phagocytosis. NO seems to be involved in most of these processes, and also can ultimately lead to tissue injury [33-34].

Previous studies have investigated the NO role in immunity to trichomonosis. Park et al. [14] showed that macrophage cytotoxicity against *T. vaginalis* is regulated by NO, with inhibition of trichomonocidal activity after macrophages exposure to L-NMMA. In other work, the parasites induced macrophage to produce proinflammatory cytokines, such as IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , and NO, via NF- $\kappa$ B [35]. *In vivo*, it was observed increase in polymorphonuclears (PMNs), vaginal epithelial cells and reactive nitrogen intermediates (RNI) levels in mice infected with isolates from symptomatic patients as compared to asymptomatic subjects [36]. Several studies have reported NO production by neutrophils, but others have claimed little or no NO production by these cells [33]. Our results demonstrate, for the first time, that the presence of *T. vaginalis* trophozoites was able to increase the NO production by human neutrophils. The inducible form of NOS is synthesized upon cell activation and this was originally described in macrophages [37]. However, despite those immune cells are major producers of NO, we showed that neutrophils also generate high levels of the compound in response to the presence of trichomonads due to iNOS activity, since the enzyme inhibitor, L-NMMA, reversed the observed effect.

Extracellular nucleotides are powerful signalling molecules that contribute to the regulation of a variety of biological processes [18]. After tissue damage, or during inflammation or infection, many cells release ATP, which acts as a proinflammatory immunomediator by triggering multiple immunological effector cell types including neutrophils, macrophages, dendritic cells, and lymphocytes. In neutrophils, extracellular ATP has been shown to induce the production of reactive oxygen species (ROS), stimulate degranulation, promote adhesion to endothelial cells, and contribute to the delay in neutrophil apoptosis [20]. An important study showed that P2Y<sub>2</sub> receptors represent a critical link in the signalling process, resulting in the activation of PMNs by infectious or inflammatory mediators [32]. However, our findings suggest that adenine nucleotides are not involved in NO secretion by neutrophils in

trichomonosis. Future reports may indicate other molecules and pathways that interact with the purinergic signalling promoting the activation of immune cells in *T. vaginalis* infection. Moreover, next investigations will be conducted with the human cervical and epithelial cells - that represent the main physiologic model for the study of trichomonosis because they are the host cells supporting the parasite adherence, survival, and replication in the genital tract [10].

In contrast to ATP, the antiinflammatory role of adenosine is able to reverse all the effects mentioned above [38]. Thus, ectonucleotidases are important modulators of immune response, since they control the degradation of ATP to adenosine through the purinergic cascade [18]. Inosine, produced by adenosine deamination, also exhibit potent immunomodulatory effects, suppressing synthesis of proinflammatory mediators by macrophages, lymphocytes and neutrophils [39]. In this sense, we verified that adenosine and inosine did influence the decrease on NO production by neutrophils. These suppressive effects may generate consequences on the parasitism, contributing to the establishment of infection by *T. vaginalis* trophozoites. In Fig. 3, the significant difference observed on NO production between the isolates, in the presence of AMP, shows the importance of ecto-5'-nucleotidase in providing adenosine. The 30236 isolate displays higher enzyme activity than the clinical isolate, LACM2, producing ultimately higher rates of adenosine and decreasing the NO levels. Tasca et al. [40] reported that some isolates has little or no ecto-5'-nucleotidase activity. This finding is surprising since the parasite is dependent on salvage pathways to generate *de novo* nucleotides [41-42]. Furthermore, the low enzyme activity may cause outcome for both host and parasite during infection, considering that decreased amounts of adenosine as an antiinflammatory agent could result in acute symptoms due to leukocytic infiltration among patients infected with these organisms [40].

All inhibitory effects of adenosine on neutrophil functions are mediated by A<sub>2A</sub> receptors, which increase intracellular cAMP levels and decrease the proinflammatory action of PMNs [43]. In an important way, the activation of this receptor subtype occurs when the nucleoside is found in high concentrations. Therefore, once neutrophils have arrived at a site where there is significant tissue injury, the high

amounts of adenosine generated by damaged tissues or cells, acts as a feedback inhibitor of inflammatory neutrophil functions [38]. In this study, the effects promoted by A<sub>2A</sub> agonist and antagonist prove the receptor involvement on immunosuppressive events of adenosine.

In summary, the present report demonstrated the influence of purinergic system, specifically the enzyme ecto-5'-nucleotidase and adenosine, on NO production by neutrophils in *T. vaginalis* infection. Herein possible mechanisms related with chemoattractants production and finally with leukocytic infiltration were investigated contributing to the host-parasite interactions as well as the immunity in trichomonosis.

### **Acknowledgements**

A.P.F. is recipient of fellowship from CNPq. This study received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) grant #477348/2008-4 awarded to T.T., and from the NANOBIOTEC-Brazil program from CAPES (Brazil). The authors thank Dr. Christina Bittar and Hospital de Clínicas de Porto Alegre for neutrophils phenotypic analysis.

## References

1. World Health Organization (2001) Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. Overview and Estimates. World Health Organization, Geneva
2. Cotch MF, Pastorek JG, Nugent RP, Hillier SL, Gibbs RS, Martin DH, Eschenbach DA, Edelman R, Carey JC, Regan JA, Krohn MA, Klebanoff MA, Rao AV, Rhoads GG (1997) The vaginal infections and prematurity study group. Sex Transm Dis 24:353-360. doi: 10.1097/00007435-199707000-00008
3. Goldstein F, Goldman MB, Cramer DW (1993) Relation of tubal infertility to a story of sexually transmitted diseases. Am J Epidemiol 137:577-584
4. Viikki M, Pukkala E, Nieminen P, Hakama M (2000) Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. Acta Oncol (Madr) 39:71-75. doi: 10.1080/028418600431003
5. Cherpes T, Wiesenfeld H, Melan M, Kant JA, Consentino LA, Meyn LA, Hillier SL (2006) The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. Sex Transm Dis 33:747-752. doi: 10.1097/01.olq.0000218869.52753.c7
6. Johnston VJ, Mabey DC (2008) Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. Curr Opin Infect Dis 21:56-64. doi: 10.1097/QCO.0b013e3282f3d999
7. Van Der Pol B, Kwok C, Pierre-Louis B, Rinaldi A, Salata RA, Chen PL, Van De Wijgert J, Miro F, Mugerwa R, Chipato T, Morrison CS (2008) *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. J Infect Dis 197:548-554. doi: 10.1086/526496
8. Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G (1998) Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev 11:300-317
9. Lehker MW, Alderete JF (2000) Biology of trichomonosis. Curr Opin Infect Dis 13:37-45



10. Fichorova, RN (2009) Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *J Reprod Immunol* 83:185-189. doi: 10.1016/j.jri.2009.08.007
11. Escario A, Gómez Barrio A, Simons Diez B, Escario JA (2010) Immunohistochemical study of the vaginal inflammatory response in experimental trichomoniasis. *Acta Trop* 114:22-30. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.12.002
12. Ryu JS, Kang JH, Jung SY, Shin MH, Kim JM, Park H, Min DY (2004) Production of interleukin-8 by human neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 72:1326-1332. doi: 10.1128/IAI.72.3.1326-1332.2004
13. Shaio MF, Lin PR, Liu JY, Yang KD (1995) Generation of interleukin-8 from human monocytes in response to *Trichomonas vaginalis* stimulation. *Infect Immun* 63:3864-3870
14. Park GC, Ryu JS, Min DY (1997) The role of nitric oxide as an effector of macrophage-mediated cytotoxicity against *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol* 35:189-195. doi: 10.3347/kjp.1997.35.3.189
15. Shaio MF, Lin PR, Lee CS, Hou SC, Tang P, Yanga KD (1992) Novel Neutrophil-Activating Factor Released by *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 60:4475-4482
16. Shaio MF, Lin PR (1995) Leukotriene B4 levels in the vaginal discharges from cases of trichomoniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 89:85- 88
17. Serhan CN, Savill J (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6:1191-1197. doi: 10.1038/ni1276
18. Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783:673-694. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.024
19. Salmi M, Jalkanen S (2005) Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev Immunol* 5:760-771. doi: 10.1038/nri1705
20. Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Therapeut* 112:358-404. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.04.013

21. Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews* 87:659-797. doi: 10.1152/physrev.00043.2006
22. Zimmermann, H (2001) Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. *Drug Develop Res* 52: 44-56. doi: 10.1002/ddr.1097
23. Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2:409–430. doi: 10.1007/s11302-006-9003-5
24. Matos JAA, Borges FP, Tasca T, Bogo MR, De Carli GA, Fauth MG, Dias RD, Bonan CD (2001) Characterization of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol* 31:770-775. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00191-6
25. Tasca T, Bonan CD, De Carli GA, Battastini AMO, Sarkis JJF (2003) Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Exp Parasitol* 105:167–173. doi: 10.1016/j.exppara.2003.12.001
26. Diamond LS (1957) The establishment of various *Trichomonas* of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol* 43: 488–490
27. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:218–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
28. Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380. doi: 10.1016/0003-2697(86)90640-8
29. Boyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97:77-89
30. Di Virgilio, F (2007) Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signal* 3:1-3. doi: 10.1007/s11302-006-9048-5

31. Junger GW (2008) Purinergic regulation of neutrophil chemotaxis. *Cell Mol Life Sci* 65:2528–2540. doi: 10.1007/s00018-008-8095-1
32. Chen Y, Yao Y, Sumi Y, Li A, To UK, Elkhali A, Inoue Y, Woehrle T, Zhang Q, Hauser C, Junger WG (2010) Purinergic Signaling: A Fundamental Mechanism in Neutrophil Activation. *Science Signal* 125:ra45. doi: 10.1126/scisignal.2000549
33. Armstrong R (2001) The physiological role and pharmacological potential of nitric oxide in neutrophil activation. *Int Immunopharmacol* 1:1501–1512. doi: 10.1016/S1567-5769(01)00094-7
34. Wink DA, Mitchell JB (1998) Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25:434-456. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00092-6
35. Han IH, Goo SY, Park SJ, Hwang SJ, Kim YS, Yang MS, Ahn MH, Ryu JS (2009) Proinflammatory cytokine and nitric oxide production by human macrophages stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol*, 47:205-212. doi: 10.3347/kjp.2009.47.3.205
36. Malla N, Yadav M, Gupta I (2007) Kinetics of serum and local cytokine profile in experimental intravaginal trichomoniasis induced with *Trichomonas vaginalis* isolates from symptomatic and asymptomatic women. *Parasite Immunol* 29:101–105. doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00914.x
37. Coleman J (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 1:1397–1406. doi: 10.1016/S1567-5769(01)00086-8
38. Haskó G, Cronstein BN (2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 25:33-39. doi: 10.1016/j.it.2003.11.003
39. Haskó G, Sitkovsky MV, Szabó, C (2004) Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends Pharmacol Sci* 25:152-157. doi: 10.1016/j.tips.2004.01.006
40. Tasca T, Bonan CD, De Carli GA, Sarkis JJ, Alderete, JF (2005) Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*, 131:71-78. doi: 10.1017/S0031182005007377

41. Heyworth PG, Gutteridge WE, Ginger CD (1982) Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. FEBS Lett 141:106–110. doi: 10.1016/0014-5793(82)80026-4
42. Heyworth PG, Gutteridge WE, Ginger CD (1984) Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. FEBS Lett 176:55–60. doi: 10.1016/0014-5793(84)80910-2
43. Thibault N, Burelout C, Harbour D, Borgeat P, Naccache PH, Bourgoin SG (2002) Occupancy of adenosine A<sub>2A</sub> receptors promotes fMLP-induced cyclic AMP accumulation in human neutrophils: impact on phospholipase D activity and recruitment of small GTPases to membranes. J Leukoc Biol 71:367–377

## Figure captions

**Fig. 1** Effects of LPS (positive control), *T. vaginalis* isolates (ATCC 30236 and LACM2) and iNOS inhibitor (L-NMMA) on NO production by neutrophils. LPS and the parasites were able to increase the NO release, while L-NMMA reversed the effect. Bars represent the mean  $\pm$  S.D. of of at least three independent experiments. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey test ( $p < 0.05$ ). Symbols represent difference when compared with: \* neutrophils alone (control); # neutrophils stimulated with *T. vaginalis* isolates.

**Fig. 2** Effects of adenine nucleotides and a non-hydrolyzable ATP analog (ATP $\gamma$ S) on NO production by neutrophils stimulated with *T. vaginalis*. ATP, ADP and ATP $\gamma$ S caused no significant changes compared to trophozoites only. Bars represent the mean  $\pm$  S.D. of at least three independent experiments. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey test ( $p < 0.05$ ).

**Fig 3** Effects of AMP, adenosine, inosine, ecto-5'-nucleotidase and ADA inhibitors (AMPCP and EHNA, respectively) on NO production by neutrophils stimulated with *T. vaginalis*. The ecto-5'-nucleotidase showed play an important role on nucleoside generation. Adenosine and inosine triggered low levels on NO secretion. Bars represent the mean  $\pm$  S.D. of at least three independent experiments. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey test ( $p < 0.05$ ). Symbols represent difference when compared with: \* neutrophils stimulated with *T. vaginalis* isolates; # effect of AMP.

**Fig 4** Influence of A<sub>2A</sub> receptor agonist (CGS 21680) and antagonist (caffeine) on NO production by neutrophils stimulated with *T. vaginalis*. The presence of agonist CGS 21680 caused a low NO production, as well as adenosine. The antagonist, caffeine, reversed the effect of the nucleoside. Bars represent the mean  $\pm$  S.D. of at least three independent experiments. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey test

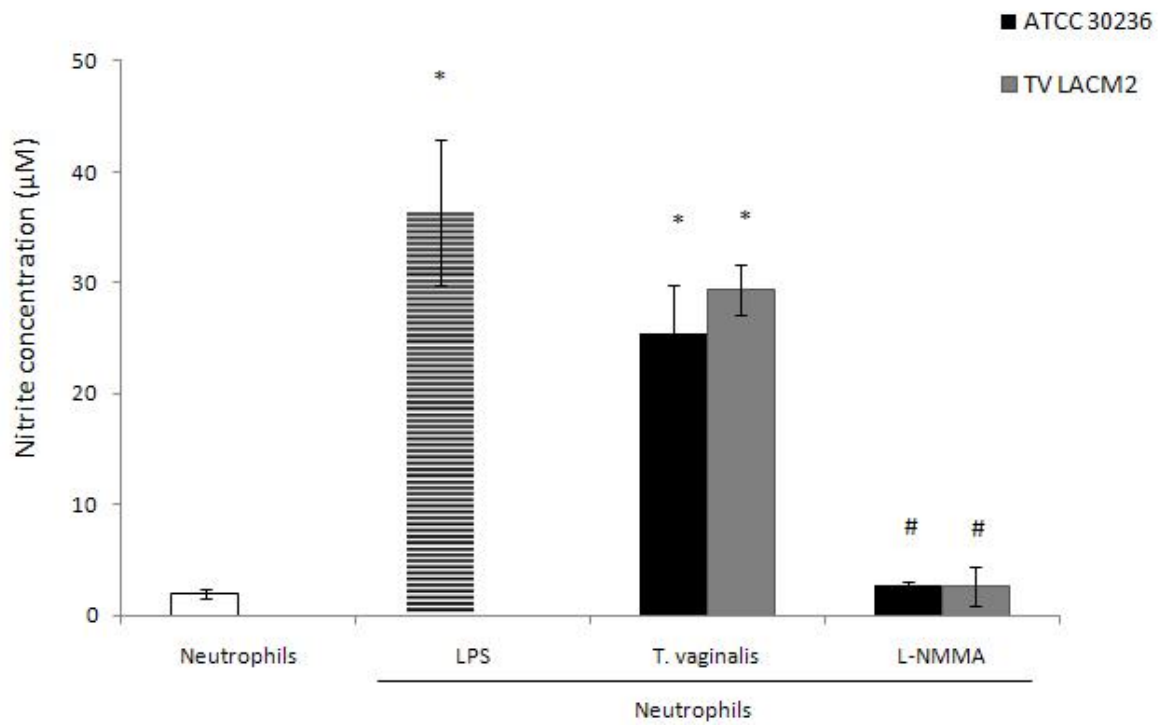
( $p < 0.05$ ). Symbols represent difference when compared with: \* neutrophils stimulated with *T. vaginalis* isolates; # effect of adenosine; § effect of CGS 21680.

**Table 1** *T. vaginalis* NTPDase and ecto-5'-nucleotidase specific hydrolytic activities.

<i>Isolate</i>	<i>ATP</i>	<i>ADP</i>	<i>AMP</i>
ATCC 30236	1.07±0.04	0.65±0.01	0.32±0.01
TV LACM2	0.96±0.21	0.49±0.04	0.04±0.03*

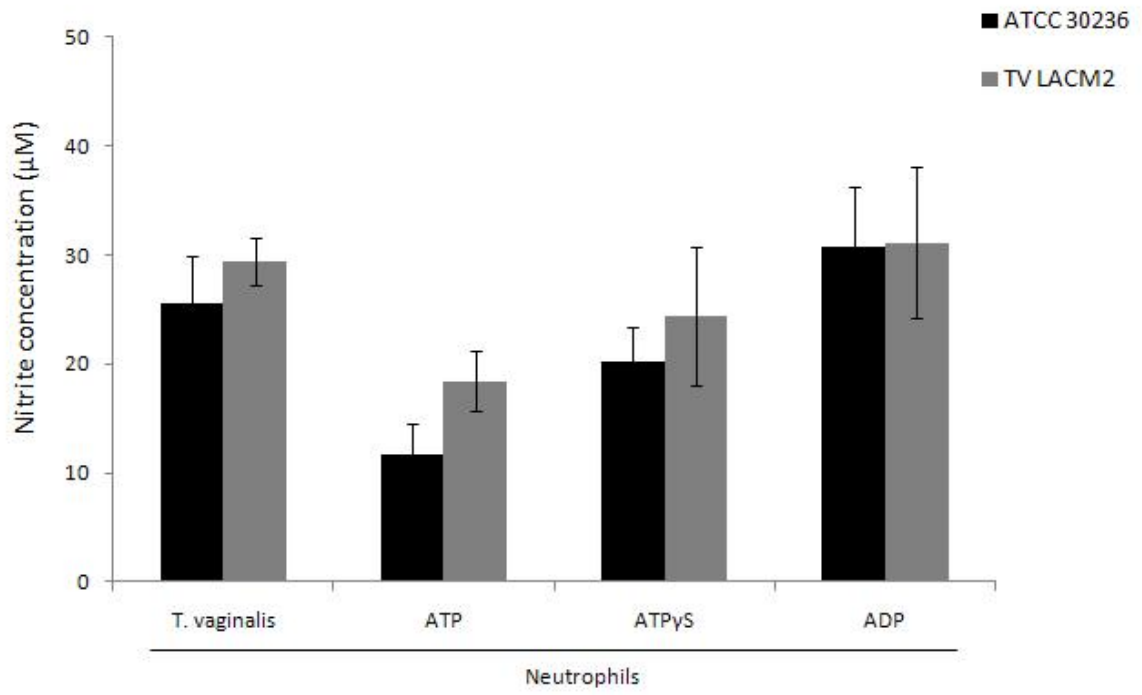
Data represent the mean  $\pm$  SD for at least three experiments and were analysed statistically by Student's *t* test. Specific activities are expressed in nmol Pi/min/mg protein. \* Significant difference between the isolates.

**Figure 1**

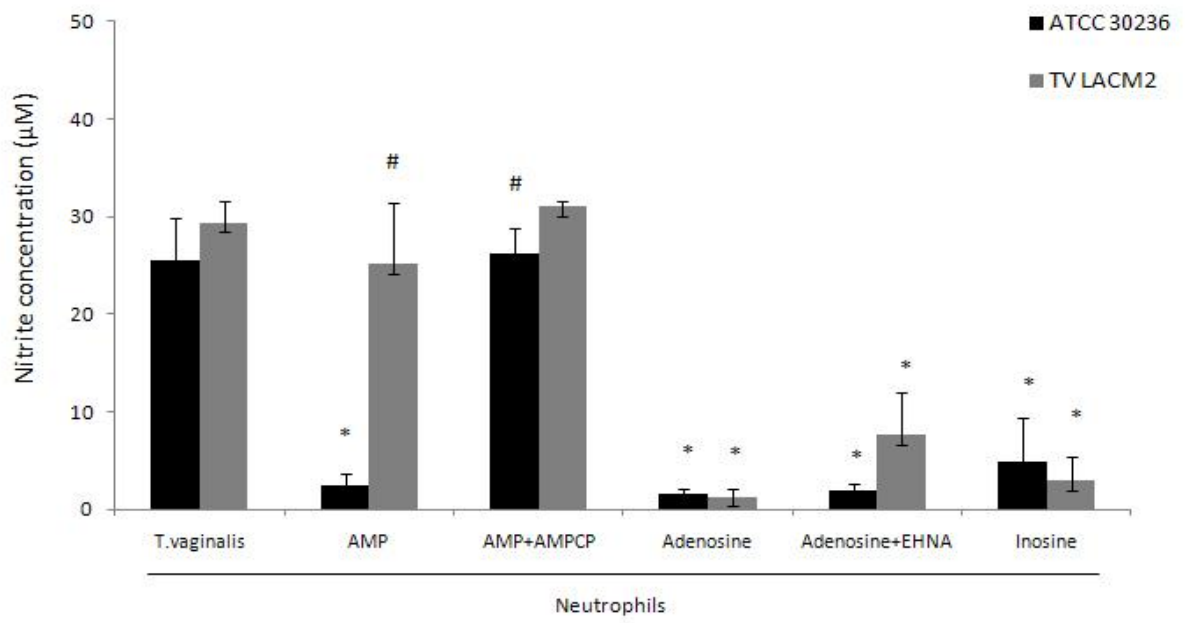




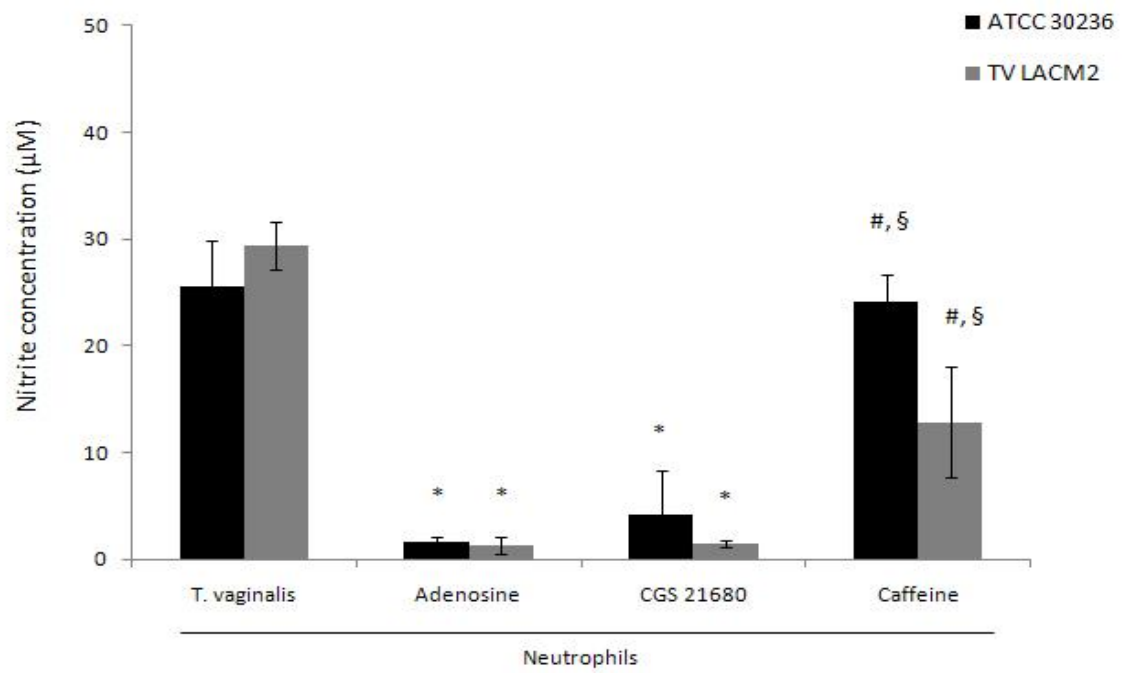
**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**





## **PARTE III**



---

---

## III.1. Discussão Geral





A tricomonose, infecção do trato genitourinário humano causada pelo protozoário *T. vaginalis*, afeta em torno de 174 milhões de pessoas a cada ano e trata-se da DST de origem não viral mais comum no mundo (WHO, 2001). A infecção é capaz de causar quadros de vaginites, uretrites e prostatites. Além disso, diversas complicações de saúde estão associadas à tricomonose, incluindo doença inflamatória pélvica, aumento do risco de infertilidade, predisposição ao câncer cervical, dificuldades na gestação, baixo peso de recém nascidos e, com grande importância, associação à transmissão do vírus HIV (LEHKER e ALDERETE, 2000; JOHNSTON e MABEY, 2008). O arsenal terapêutico para o tratamento da infecção por *T. vaginalis* é bastante limitado, contando com apenas dois fármacos aprovados pelo FDA, o metronidazol e o tinidazol, ambos membros da classe dos 5-nitroimidazóis. Embora o metronidazol seja o fármaco de primeira escolha na terapêutica, diversos efeitos adversos estão relacionados ao uso do medicamento. Além disso, inúmeros casos clínicos com parasitos resistentes ao fármaco têm sido relatados, sendo que a ocorrência da resistência é superior na tricomonose quando comparada a infecções por *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*, outros protozoários patogênicos cujo tratamento segue o mesmo esquema terapêutico (ALI e NOZAKI, 2007). Atualmente, outras alternativas medicamentosas não estão disponíveis para o manejo de pacientes infectados com isolados resistentes aos nitroimidazóis. Dessa forma, diante deste cenário, uma das estratégias baseia-se na busca por novos compostos anti-*Trichomonas* estruturalmente distintos em relação aos 5-nitroimidazóis e, conseqüentemente, citotóxicos por diferentes mecanismos de ação (GIORDANI, 2010). Paralelamente, a investigação de novos alvos terapêuticos é uma abordagem eficiente e capaz de conduzir racionalmente a descobertas de novos agentes antiparasitários.

A caracterização de proteínas ou macromoléculas alvos é uma estratégia importante para o posterior desenvolvimento de fármacos seletivos. O conhecimento de diferenças entre o parasito e seu hospedeiro, em relação à estrutura macromolecular ou ao metabolismo, é primordial e fornece subsídio para uma busca racional de novos

quimioterápicos (DATTA *et al.*, 2008). Dessa maneira, a investigação de aspectos fisiológicos e bioquímicos representa um avanço no entendimento da biologia do parasito e permite a prospecção de alvos que atuem especificamente sobre o microrganismo. No entanto, na busca pelo sucesso do parasitismo, o processo evolutivo leva à seleção de rotas metabólicas e enzimas do parasito que estejam adaptadas à sobrevivência no interior do hospedeiro (MANSOUR, 2002). Neste sentido, mais pesquisas devem ser conduzidas na tentativa de traçar diferenças entre os organismos; no caso de alvos enzimáticos, por exemplo, as distinções podem ser de nível estrutural, cinético ou ainda, quanto à sensibilidade a inibidores.

Mesmo considerando o desafio acima mencionado, a abordagem moderna de alvo quimioterápico ideal tem como princípio a descoberta de alvos específicos, seletivamente tóxicos ao parasito, e dentro deste contexto, destaca-se o estudo do metabolismo do agente patogênico. As células do parasito, assim como as mamíferas, dispõem de centenas de rotas metabólicas operando em conjunto para manter sua viabilidade e funcionalidade. As reações enzimáticas catalisam diferentes etapas nestas vias e controlam a formação dos produtos finais necessários para sobrevivência das células (MANSOUR, 2002). Assim, os agentes seletivos contra o crescimento de um parasito podem apresentar uma ou ambas das seguintes propriedades: (i) ativação seletiva de compostos por enzimas do organismo invasor, as quais não estão presentes nas células não infectadas, e (ii) inibição seletiva de enzimas vitais, as quais são necessárias para sua reprodução (DATTA *et al.*, 2008).

O sistema purinérgico de diversos parasitos vem sendo amplamente estudado e tem demonstrado exercer influência sobre funções essenciais dos organismos, na mesma forma que colabora para o estabelecimento das infecções (SANSOM *et al.*, 2008). A sinalização purinérgica é baseada na liberação de nucleotídeos para o espaço extracelular, os quais podem ser degradados por uma família de ectonucleotidasas, levando à produção de uma série de nucleotídeos intermediários e nucleosídeos (ZIMMERMANN, 2001). Dessa forma, a cascata purinérgica controla dinamicamente os níveis de purinas extracelulares, que finalmente serão capazes de desenvolver seus

efeitos através da ativação de um grande número de receptores de membrana denominados purinoceptores (BURNSTOCK, 1976). 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*, o sistema purinérgico desempenha papel importante na sobrevivência dos trofozoítos, considerando que estes são incapazes de sintetizar *de novo* nucleotídeos púricos e pirimídicos e dependem assim, das vias de salvação (HEYWORTH *et al.*, 1982; 1984). Além disso, a adenosina assume um papel chave no metabolismo das purinas, pois é considerada o precursor de todos os nucleotídeos, sendo capaz de converter adenina à GMP (MUNAGALA e WANG, 2003). A sinalização purinérgica também demonstra atuar sobre o curso da infecção, modulando os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares através de ectonucleotidases do parasito e, contribuindo dessa forma, na patogênese da tricomonose. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa já caracterizaram as enzimas NTPDase (MATOS *et al.*, 2001), ecto-5'-nucleotidase (TASCA *et al.*, 2003) e adenosina deaminase (dados não publicados) em trofozoítos intactos de *T. vaginalis*, sugerindo que estas poderiam exercer suporte para o desenvolvimento da infecção.

Diante do contexto apresentado, o capítulo I desta dissertação teve o objetivo de investigar a participação das ectonucleotidases de *T. vaginalis* na produção de adenosina. A limitação de soro no meio de cultivo dos trofozoítos promove uma situação de privação de adenosina - nutriente fundamental para o crescimento do parasito - possibilitando a observação da capacidade das enzimas do protozoário em prover o nucleosídeo. A escolha em desenvolver o trabalho com dois isolados paralelamente, foi baseada no intuito de traçar comparações entre o perfil enzimático de um isolado padrão (ATCC30236) e de um clínico (LACH1). A primeira diferença foi demonstrada na curva cinética de crescimento, sob a condição de limitação de soro. Enquanto o isolado clínico manteve sua viabilidade, morfologia íntegra, e exibiu crescimento normal dentro de um período de 24 horas, o isolado padrão nas primeiras

horas de incubação mostrou alterações em sua morfologia, motilidade e apresentou significativa diminuição de crescimento. Esses achados não são surpreendentes considerando a capacidade adaptativa dos trofozoítos. O isolado 30236 encontra-se em cultivo *in vitro* por um longo período estando altamente adaptado; dessa forma, quando submetido a uma condição adversa não é capaz de preservar suas características e sustentar seu crescimento. Neste sentido, Lehker e Alderete (1990) demonstraram que parasitos mantidos em meio de cultivo suplementado com soro não conseguem permanecer viáveis por mais de 4-6 horas no ambiente vaginal, o qual é nutricionalmente limitado. Diferentemente, isolados clínicos exibem uma eficiente adaptação a mudanças no ambiente. Isso porque a vagina é um dos sítios de infecção mais complexos para um parasito de mucosa, sofrendo constantes variações devido à influência do ciclo hormonal. Além disso, os trofozoítos possuem vias de sinalização associadas a mudanças no ambiente, o que os torna capazes de regular mecanismos transcricionais e pós-transcricionais de acordo com as condições em que se encontram (LEHKER e ALDERETE, 2000).

Após conhecer o padrão de crescimento dos isolados em uma situação de limitação de nutrientes, passamos a investigar o perfil enzimático da NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis* sob esta condição. Considerando que os parasitos não realizam síntese *de novo* de nucleotídeos púricos e que o soro adicionado ao meio de cultivo é a fonte de adenosina para os protozoários, a nossa hipótese foi de que as ectonucleotidases dos trofozoítos seriam capazes de fornecer a adenosina necessária para recaptção e sobrevivência dos tricomonas. Conforme o esperado, a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP foi significativamente maior nos parasitos mantidos em soro a 1,0 % comparado ao grupo controle (trofozoítos cultivados em meio suplementado com soro a 10 %). O aumento de 154,4 %, 176,1 % e 302,5 % na hidrólise do ATP, ADP e AMP, respectivamente, no isolado padrão, e de 14,4 %, 22,5 % e 162,5 % no isolado clínico, vai ao encontro da hipótese inicial. A observação do maior aumento de hidrólise ocorrer sobre o AMP, em ambos os isolados, sugere fortemente a habilidade da ecto-5'-nucleotidase – enzima que atua na última etapa da

cascata enzimática – produzir adenosina a partir do nucleotídeo monofosfatado. Ainda avaliando a atividade das ectonucleotidases, a taxa de hidrólise dos três nucleotídeos na condição controle mostra-se maior no isolado clínico, LACH1, do que naquele cultivado por longo período (ATCC 30236). Esses resultados estão em acordo com estudos anteriores (DE JESUS *et al.*, 2002; TASCA *et al.*, 2005) e podem representar envolvimento das enzimas na virulência. No sítio da tricomonose, a concentração de nucleotídeos pode atingir até 10 mM como resultado do dano tecidual; neste ambiente, isolados que exibam uma alta atividade enzimática apresentam maior condição de se instalar e estabelecer a infecção, devido a sua capacidade de degradar o ATP citotóxico e gerar adenosina anti-inflamatória.

Na tentativa de elucidar o mecanismo envolvido na ativação das ectonucleotidases, investigamos o efeito da privação de soro no controle transcricional da NTPDase através da expressão gênica de duas sequências correspondentes encontradas no genoma do parasito. Em ambos os isolados a limitação de nutrientes foi capaz de regular em nível transcricional a atividade da NTPDase, promovendo aumento dos níveis de RNA mensageiro.

Após verificar que a limitação de soro causa aumento da hidrólise dos nucleotídeos extracelulares, e que a ativação da NTPDase é regulada transcionalmente, a análise do metabolismo dos nucleotídeos foi conduzida. O perfil encontrado está de acordo com os achados de atividade enzimática, onde se sugeria uma maior degradação dos nucleotídeos com conseqüente formação de adenosina pelos trofozoítos mantidos em baixa concentração de soro quando comparados com os controles. Observa-se ainda, que devido à maior atividade apresentada pelo isolado clínico em relação ao padrão, o consumo de ATP e a geração dos nucleotídeos intermediários, ADP e AMP, são mais elevados neste isolado (LACH1). A queda da concentração de adenosina ao longo do tempo, ocorrida na condição teste em ambos os isolados, pode ser reflexo da rápida aquisição do nucleosídeo pelos parasitos. Em *T. vaginalis*, a adenosina é rapidamente recaptada e dentro de poucos segundos já se encontra inserida em nucleotídeos, essencialmente ATP e ADP (HARRIS *et al.*, 1988).

Com a finalidade de melhor compreender o destino da adenosina nos trofozoítos cultivados em privação de soro, a avaliação do ciclo celular foi realizada. A depleção de soro é considerada a metodologia mais frequentemente empregada para realizar a sincronização de células nos estágios G0/G1. Este fato ocorre devido a uma diminuição do metabolismo celular com posterior indução de quiescência (GOISSIS *et al.*, 2007). Rapaport e Zamecnik (1978) mostraram que a privação de soro em células mamíferas promoveu aumento do *pool* de nucleotídeos da adenina. Os autores sugerem que o aumento da incorporação de adenosina nos nucleotídeos possa atuar como um sinalizador, mediando a resposta intracelular às mudanças no ambiente e finalmente, levando a uma lenta proliferação celular. O mesmo fenômeno pode ter ocorrido em nosso estudo, já que nos dois isolados a limitação de soro levou ao atraso do ciclo celular com aumento do número de células nas fases G0/G1. Os resultados também podem explicar o consumo total da adenosina observado nos experimentos anteriores (Capítulo I - figuras 4 e 5), sugerindo que o destino do nucleosídeo possa ser realmente uma rápida incorporação nos nucleotídeos da adenina.

Considerando o sistema purinérgico de *T. vaginalis*, uma das principais funções atribuídas a este é a sua capacidade em prover adenosina, visando a manutenção do crescimento dos trofozoítos e o estabelecimento da infecção. Os resultados do capítulo I vêm ao encontro desta especulação, demonstrando pela primeira vez, que em uma condição de privação de adenosina as ectonucleotidasas do parasito, especificamente NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, encontram-se ativadas e provavelmente, desempenhando importante papel na geração do nucleosídeo.

O interesse em investigar uma possível relação entre sinalização purinérgica e resposta imune na tricomonose levou ao desenvolvimento do capítulo II desta dissertação. A tricomonose é uma infecção bastante recorrente e dessa maneira, a resposta imune inata assume papel de destaque no controle da parasitose. O processo inflamatório desencadeado é controlado a nível molecular por uma variedade de sinais produzidos por mastócitos, plaquetas, linfócitos e células endoteliais; em nível celular, há um aumento da infiltração leucocitária e da vascularização, formação de edema e,

em casos graves, aparecimento de hemorragia. Neste cenário, o infiltrado de neutrófilos tem sido considerado o principal responsável pelas mudanças citológicas observadas no sítio de infecção (ESCARIO *et al.*, 2010). O recrutamento destes pode ser mediado por quimioatraentes e agentes proinflamatórios como, interleucinas, leucotrieno B4 e intermediários reativos de nitrogênio, os quais têm seus níveis aumentados em diversos tipos de células imunes após contato com *T. vaginalis* (CAUCI e CULHANE, 2007; RYU *et al.*, 2004; SHAIQ *et al.*, 1992, 1995; HAN *et al.*, 2009). No entanto, apesar destes achados, sabe-se muito pouco sobre as condições que levam ao acúmulo de neutrófilos e o modo como estes atuam na resposta inflamatória inicial frente à tricomonose.

Com base no exposto acima, a busca por mecanismos que possam estar envolvidos com a liberação de moléculas quimioatraentes e finalmente, com o processo de infiltração leucocitária é de fundamental importância para o entendimento da relação parasito-hospedeiro. Neste sentido, a análise do sistema purinérgico torna-se uma abordagem interessante, visto que: (i) o sítio da infecção por *T. vaginalis* pode apresentar altas concentrações de nucleotídeos extracelulares, os quais atuam como importantes sinalizadores e moléculas proinflamatórias, (ii) ectonucleotidases de neutrófilos e de *T. vaginalis* já foram caracterizadas e são enzimas capazes de modular os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos no espaço extracelular, (iii) a adenosina pode causar um pronunciado efeito anti-inflamatório, e (iv) os neutrófilos expressam uma série de purinoceptores em sua superfície (BOURS *et al.*, 2006; DI VIRGILIO, 2007).

Considerando os diversos fatores descritos acima, o objetivo proposto foi avaliar o efeito dos nucleotídeos/nucleosídeo da adenina, e a participação das ectonucleotidases e purinoceptores sobre a produção de NO por neutrófilos estimulados com *T. vaginalis*. A função do NO sobre a resposta inflamatória ainda não está completamente elucidada, no entanto seu envolvimento na tricomonose já foi previamente descrito. O NO produzido por macrófagos mostrou atuar como um efetor da citotoxicidade contra o parasito, sendo que inibidores da NOS foram capazes de reverter tal efeito, assim como a presença da enzima arginase, que promove a

degradação de um substrato essencial para a síntese de NO (PARK *et al.*, 1997). Han *et al.* (2009) demonstraram que na tricomonose a ativação de NF- $\kappa$ B, que finalmente leva à produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos, é dependente de NO. Além disso, a expressão da iNOS foi encontrada em leucócitos e secreções vaginais de pacientes sintomáticas e assintomáticas, enquanto nas amostras colhidas de mulheres livres de infecção a proteína não foi detectada (YADAV *et al.*, 2006).

A investigação da síntese de NO por neutrófilos cultivados com *T. vaginalis* é inovadora e os resultados apontam para a habilidade dos parasitos em estimular a produção do composto. Os neutrófilos sozinhos mostraram secretar concentrações muito baixas de NO, o que é justificado pelo fato de que sua produção é geralmente regulada por algum estímulo capaz de induzir a expressão gênica da iNOS através de uma via mediada por NF- $\kappa$ B (XIE *et al.*, 1994). Essa estimulação foi promovida pela presença do lipopolissacarídeo (LPS) assim como, pelos trofozoítos de *T. vaginalis*. Alguns autores afirmam que linfócitos T, mastócitos e neutrófilos são células imunes incapazes de produzir quantidades significativas de NO (COLEMAN, 2001); no entanto, contrariando essas informações, diversos estudos demonstram a síntese do composto por neutrófilos especialmente após ativação. Os polimorfonucleares (PMN) isolados de exsudatos inflamatórios ou de sítios de infecção, por exemplo, apresentam atividade e expressão da iNOS aumentadas. As mesmas observações são atribuídas aos neutrófilos ativados com citocinas (EVANS *et al.*, 1996; TAKEICHI *et al.*, 1998; WHEELER *et al.*, 1997). O aumento da produção de NO após estímulo por *T. vaginalis*, evidenciado no presente trabalho, foi completamente revertido na presença de um inibidor da forma induzível de NOS (L-NMMA), sugerindo da mesma maneira que os estudos acima, o envolvimento da enzima na geração do composto.

Após verificar a influência dos trofozoítos na síntese de NO pelos neutrófilos, a participação do sistema purinérgico sobre esse processo foi analisada. O ATP tem sido considerado uma molécula endógena integrante do grupo de “alarminas”, as quais desempenham efeitos quimiotáticos e ativadores sobre neutrófilos, da mesma forma que atuam como potentes estimuladores da resposta imune inata (OPPENHEIM e



YANG, 2005, CHEN *et al.*, 2010; GRASSI, 2010; KUKULSKI *et al.*, 2009). Apesar disso, resultados bastante controversos são encontrados acerca da relação entre nucleotídeos, nucleosídeos da adenina e migração leucocitária, o que pode ser justificado pelo fato de que a sinalização purinérgica controla diversas etapas do processo quimiotático e modula passos-chaves desse mecanismo (JUNGER, 2008). Nossos resultados mostraram que os nucleotídeos da adenina não estão envolvidos com a secreção de NO. A hidrólise do ATP por ação de NTPDases do parasito ou dos neutrófilos foi considerada e na tentativa de esclarecer essa hipótese utilizou-se um análogo não hidrolizável do ATP, o qual também não causou mudança significativa na produção de NO, fornecendo maior subsídio aos resultados encontrados.

Da mesma maneira que o ATP, os níveis extracelulares de adenosina elevam-se em resposta ao dano tecidual, no entanto, o nucleosídeo assume um papel oposto àquele desempenhado pelo nucleotídeo, promovendo *feedback* negativo à intensa sinalização causada pelo ATP (BOURS *et al.*, 2006). A adenosina exerce efeito anti-inflamatório em neutrófilos através da ativação dos receptores P1, especialmente o subtipo A<sub>2A</sub>. Entre as suas principais ações sobre os PMNs destacam-se, a redução do dano oxidativo e da degranulação, a diminuição da adesão às células endoteliais, e, interessante, a inibição da produção de diversos mediadores inflamatórios (HASKÓ e CRONSTEIN, 2004; LINDEN, 2001). Os resultados aqui encontrados são consistentes com os efeitos imunossupressores relatados, considerando que a síntese de NO pelos neutrófilos foi fortemente diminuída na presença do nucleosídeo. Da mesma maneira, o produto de degradação da adenosina, a inosina, apresenta propriedades anti-inflamatórias bem estabelecidas, sendo capaz de reduzir a produção de TNF- $\alpha$  e bloquear a geração de fMLP (do inglês, *formyl-Met-Leu-Phe*) em PMNs (HASKÓ *et al.*, 2004). Similarmente, nos neutrófilos estimulados com *T. vaginalis* a inosina afetou a síntese de NO, mantendo baixos os níveis do composto, assim como o seu precursor adenosina. A importância do papel modulador da adenosina torna-se evidente ao se avaliar os resultados obtidos após a incubação dos neutrófilos e parasitos na presença do AMP. A atividade da ecto-5'-nucleotidase, enzima

responsável pela hidrólise do AMP e consequente formação do nucleosídeo, apresenta uma considerável diferença entre os isolados investigados; a atividade enzimática do isolado padrão, 30236, é cerca de sete vezes maior do que aquela desempenhada pelo isolado clínico, LACM2. Dessa forma, os perfis enzimáticos podem explicar a significativa discordância encontrada entre a produção de NO pelos neutrófilos cultivados com os dois diferentes isolados. Conforme descrito no capítulo II, essa baixa produção de adenosina observada no isolado clínico pode acarretar consequências aos trofozoítos, que são dependentes do nucleosídeo, e ao hospedeiro, o qual poderá desenvolver uma sintomatologia mais aguda devido às baixas concentrações de adenosina anti-inflamatória. Esses achados são muito importantes, pois revelam o mérito da cascata enzimática e o papel das ectonucleotidases de *T. vaginalis* em prover adenosina, o que finalmente terá impacto no estabelecimento da infecção.

Os neutrófilos expressam os quatro subtipos de receptores P1 - A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, mas é a ativação dos receptores A<sub>2A</sub> a responsável por desencadear os efeitos imunossupressivos da adenosina. A preferência por este subtipo ocorre quando o nucleosídeo encontra-se em altas concentrações, como em tecidos lesados ou células em condições de estresse (KUMAR e SHARMA, 2009). Nesses sítios, o aumento dos níveis de adenosina é atribuído essencialmente à ação das ectonucleotidases sobre as moléculas de ATP (HASKÓ e CRONSTEIN, 2004). Com o objetivo de confirmar se a redução da síntese de NO na presença de adenosina poderia ser atribuída à ativação dos receptores A<sub>2A</sub> de neutrófilos, investigou-se o envolvimento do receptor através de um agonista (CGS21680) e de um antagonista (cafeína). Como esperado, a presença do agonista mimetizou o efeito da adenosina, enquanto o antagonista foi capaz de revertê-lo.

Considerando a relevância dos neutrófilos no curso da tricomonose, torna-se fundamental uma melhor compreensão acerca dos mediadores inflamatórios responsáveis pela infiltração leucocitária. Os resultados obtidos no segundo capítulo demonstram o envolvimento dos trofozoítos de *T. vaginalis* na produção de NO por

neutrófilos, assim como evidenciam a influência da sinalização purinérgica, em especial o sistema adenosinérgico, sobre esse processo. Neste sentido, o presente estudo contribui para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção e colabora com o conhecimento da relação parasito-hospedeiro e imunidade na tricomonose.

Finalmente, a abordagem desta dissertação permitiu a avaliação de importantes funções, até então especuladas, do sistema purinérgico de *T. vaginalis*. O capítulo I demonstrou a efetiva participação das ectonucleotidases na produção de adenosina, enquanto o segundo capítulo evidenciou o papel anti-inflamatório do nucleosídeo e a influência da cascata de enzimática sobre a produção de um mediador inflamatório. Desta forma, os resultados aqui apresentados trazem contribuições sobre o metabolismo dos nucleotídeos extracelulares do parasito e ainda, auxiliam na compreensão de aspectos imunes da tricomonose. Além disso, o desenvolvimento deste trabalho colabora com a investigação de um sistema bioquímico essencial para a sobrevivência de *T. vaginalis* e extremamente importante para o estabelecimento da infecção, sendo considerado, portanto, uma alternativa na busca de novos alvos terapêuticos para o tratamento da tricomonose.



---

---

## III.2. Conclusões Gerais



Os resultados obtidos no desenvolvimento desta dissertação permitem as seguintes conclusões:

#### Do capítulo I

- O isolado padrão, ATCC30236, apresenta maior sensibilidade à condição de limitação de soro quando comparado ao isolado clínico LACH1;
- Na condição testada, o aumento da taxa de hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP é superior no isolado ATCC30236 do que no clínico, provavelmente indicando maior dependência da recaptção de adenosina;
- A limitação de soro promove aumento da expressão gênica da NTPDase de *T. vaginalis*, sugerindo um eficiente mecanismo regulatório em nível transcricional;
- Sob a condição testada, os trofozoítos apresentam atraso do ciclo celular nas fases G0/G1, indicando um possível aumento de incorporação da adenosina nos *pools* intracelulares de nucleotídeos da adenina;
- As enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis* desempenham um papel importante na geração de adenosina, contribuindo para a manutenção do crescimento dos parasitos.

#### Do capítulo II

- A produção de NO pelos neutrófilos através da enzima iNOS é estimulada por trofozoítos de *T. vaginalis*;
- A secreção de NO por neutrófilos estimulados com o parasito não foi influenciada pelos nucleotídeos da adenina;
- A adenosina e o seu produto de degradação, inosina, exercem efeito anti-inflamatório, acarretando a diminuição dos níveis de NO produzidos pelos neutrófilos ativados com os trofozoítos;

- A ecto-5'-nucleotidase é uma enzima chave na produção de adenosina e dessa forma, os isolados que apresentam baixa atividade enzimática produzem níveis significativamente menores do nucleosídeo, o que pode provocar sérias consequências na relação parasito-hospedeiro;
- A ação anti-inflamatória promovida pela adenosina é desencadeada através da ativação dos receptores  $A_{2A}$  de neutrófilos;
- O sistema purinérgico de *T. vaginalis*, especialmente a enzima ecto-5'-nucleotidase e o nucleosídeo adenosina, modulam a secreção de NO por neutrófilos estimulados com o parasito. Esses resultados sugerem que a sinalização purinérgica é, provavelmente, um dos mecanismos envolvidos na produção de mediadores inflamatórios na resposta imune contra a tricomonose.







A continuidade dos estudos acerca do envolvimento da sinalização purinérgica na patogênese de *T. vaginalis* permite algumas perspectivas:

1. Avaliação da influência do sistema purinérgico de *T. vaginalis* na citotoxicidade às células epiteliais vaginais;
2. Investigação da participação de purinoceptores das células epiteliais vaginais na infecção por *T. vaginalis*;
3. Análise da atividade enzimática e expressão gênica das ectonucleotidases em trofozoítos de *T. vaginalis* aderidos às células epiteliais vaginais;
4. Realização do silenciamento gênico da NTPDase de *T. vaginalis*;
5. Avaliação do envolvimento do sistema purinérgico de *T. vaginalis* sobre a produção de quimiocinas por células epiteliais vaginais, ectocervicais e células endoteliais.



---

---

## III.4.Referências



- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J. M.; BARNARD, E. A.; BOYER, J. L.; KENNEDY, C.; KNIGHT, G. E.; FUMAGALLI, M.; GACHET, C.; JACOBSON, K. A.; WEISMAN, G. A. International Union of Pharmacology. Update and subclassification of the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological Reviews*, v. 58, p. 281–341, 2006.
- 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.
- ACKERS, J. P. Immunologic aspects of human trichomonosis. In: HONIGBERG, B. M. (Ed.). *Trichomonads Parasitic in Humans*. New York: Springer, 1990. p. 36-52.
- 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.; 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.
- 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.; NGUYEN, J.; MUNDODI, V.; LEHKER, M. W. Heme-iron increases levels of AP65-mediated adherence by *Trichomonas vaginalis*. *Microbial Pathogenesis*, v. 36, p. 263–271, 2004.
- ALDERETE, J. F.; PROVENZANO, D.; LEHKER, M. W. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microbial Pathogenesis*, v. 19, p. 93–103, 1995.
- 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, v. 20, p. 164-187, 2007.
- AHN, M. H.; SONG, H. O.; RYU, J. S. *Trichomonas vaginalis*-induced neutrophil apoptosis causes anti-inflammatory cytokine production by human monocyte-derived macrophages. *Parasite Immunology*, 2008 (no prelo).
- 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.
- ARROYO, R.; GONZALEZ-ROBLES, A.; MARTINEZ-PALOMO, A.; ALDERETE, J. F. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Molecular Microbiology*, v. 7, p. 299-309, 1993.
- BEACH, D. H.; HOLZ, G. G.; SINGH, Jr. 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, G. G.; SINGH, Jr. B. N.; LINDMARK, D. G. Phospholipid metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 44, p. 97–108, 1991.
- BEARD, C. M.; NOLLER, K. L.; O’FALLON, W. M.; KURLAND, L. T.; DOCKERTY, M. B. Lack of evidence for cancer due to use of metronidazole. *The New England Journal of Medicine*, v. 301, p. 519–522, 1979.
- 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.
- BIGONNESSE, F.; LÉVESQUE, S. A.; KUKULSKI, F.; LECKA, J.; ROBSON, S. C.; FERNANDES, M.J.; SÉVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse



- nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry*, v. 43, p. 5511-5519, 2004.
- BODIN, P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochemical Research*, v. 26, p. 959–969, 2001.
- 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.
- 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. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews*, v. 87, p. 659–797, 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.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL & PREVENTION. Trichomoniasis. Disponível em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Trichomoniasis.htm>. Acesso em: 05 de fev. 2011.
- CHAPLIN, D. D. Overview of immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, p. S3-S23, 2010.
- CHEN, Y.; YAO, Y.; SUMI, Y.; LI, A.; TO, U. K.; ELKAHL, A.; INOUE, Y.; WOEHRLE, T.; ZHANG, Q.; HAUSER, C.; JUNGER, W. G. Purinergic Signaling: A fundamental mechanism in neutrophil activation. *Science Signaling*, v. 125, p. ra45, 2010.

- 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. 2nd.; 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. 2nd.; 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.
- CROWELL, A. L.; SANDERS, L. K. A.; EVAN, S. W. *In vitro* metronidazole and tinidazole activities against metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 1407–1409, 2003.
- 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 JESUS, J. B.; DE SÁ PINHEIRO, A. A.; LOPES, A. H.; MEYER-FERNANDES, J. R. An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. *Z Naturforsch. C*, v. 57, p. 890–896, 2002.

- DE LIMA, Y. A. R.; ALVES, M. F. C. O sistema imune da mucosa do trato genital feminino e o impacto das doenças sexualmente transmissíveis. *Revista de Patologia Tropical*, v. 37, p. 295-309, 2008.
- DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signalling*, v. 1, p. 205–209, 2005.
- DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signalling*, v. 3, p. 01-03, 2007.
- ENGGBRING, J.A.; ALDERETE, J. F. Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains. *Microbiology*, v. 144, p. 3011-3018, 1998.
- ESCARIO, A.; GÓMEZ, B. A.; BARRIO, A.; SIMONS, D. B.; ESCARIO, J. A.; Immunohistochemical study of the vaginal inflammatory response in experimental trichomoniasis. *Acta Tropica*, v. 114, p. 22-30, 2010.
- EVANS, T. J.; BUTTERY, L. D.; CARPENTER, A.; SPRINGALL, D. R.; POLAK, J. M.; COHEN, J. Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingestion bacteria. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, v. 93, p. 9553–9558, 1996.
- 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.; 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.
- FIORI, P. L.; RAPPELLI, P.; ROCCHIGIANI, A. M.; CAPPUCINELLI, P. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. *FEMS Microbiology Letters*, v. 109, p.13–18, 1993.

- FREDHOLM, B. B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K. A.; KLOTZ, K. N.; LINDEN, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews*, v. 53, p. 527–552, 2001.
- 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.
- GARBER, G. E.; BOWIE, W. R. The effect of *Trichomonas vaginalis* and the role of pH on cell culture monolayer viability. *Clinical and Investigative Medicine*, v. 13, p. 71–76, 1989.
- GARBER, G. E.; LEMCHUK-FAVEL, L. T. Association of production of cell-detaching factor with the clinical presentation of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, p. 2415–2417, 1990.
- GARCIA, A. F.; ALDERETE, J. Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *BMC Microbiology*, v. 25, p. 116, 2007.
- 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.
- GIORDANI, R. B. *Atividade anti-Trichomonas vaginalis de alcalóides de Amarillidaceae e análogos de poliaminas: análise química, semi-síntese e investigação do mecanismo de ação*. 2010. 225 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre.
- GOISSIS, M. D.; CAETANO, H. V. A.; MARQUES, M. G.; DE BARROS, F. R. O.; FEITOSA, W. B.; MILAZZOTTO, M. P.; BINELLI, M.; ASSUMPCÃO, M. E. O. A.; VISINTIN, M. A. Effects of serum deprivation and cycloheximide on cell cycle of low and high passage porcine fetal fibroblasts. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, p. 660-663, 2007.

- 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.
- GOUNARIS, K. Nucleotidase cascades are catalyzed by secreted proteins of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity*, v. 70, p. 4917-4924, 2002.
- GRASSI, F. Purinergic control of neutrophil activation. *Journal of Molecular Cell Biology*, v. 2, p. 176-177, 2010.
- 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.; SITKOVSKY, M. V.; SZABÓ, C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, v. 25, p. 152-157, 2004.
- HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*, v. 25, p. 33-39, 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.
- HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E. Further studies on the purine and pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Protozoology*, v. 25, p. 9b., 1978.

- 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*, v. 176, p. 55-60, 1984.
- HONIGBERG, B. M.; BRUGEROLLE, G. Structure. In: HONIGBERG, B. M. (Ed.). *Trichomonads Parasitic in Humans*. New York: Springer, 1990. p. 05-35.
- HUGGINS, G. R.; PRETI, G. Vaginal odours and secretions. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. v. 24, p. 355–376, 1981.
- 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.
- JOHNSTON, V.J.; MABEY, D.C. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infectious Disease*, v. 8, p. 56–64, 2008.
- JUNGER, G. W. Purinergic regulation of neutrophil chemotaxis. *Cell Mol Life Sci*, 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.
- KHAKH, B. S.; NORTH, R. A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*, v. 442, p. 527-532, 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.; MODOVNIK, 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.

KRIEGER, J. N.; VERDON, M.; SIEGEL, N.; HOLMES, N. N. Natural history of urogenital trichomoniasis in men. *The Journal of Urology*, v. 149, p. 1455–1458, 1993.

KUCKNOOR, A. S.; MUNDODI, V.; ALDERETE, J. F. Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* genes. *Infection and Immunity*, v. 73, p. 6472–6478, 2005.

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.

KUKULSKI, F.; BEN, Y.; LECKA, J.; KAUFFENSTEIN, G.; LÉVESQUE, S. A.; MARTÍN-SATUÉ, M.; SÉVIGNY, J. Extracellular ATP and P2 receptors are required for IL-8 to induce neutrophil migration. *Cytokine*, v. 49, p. 166-170, 2009.

KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 199-212, 1999.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Adenosine: An endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *European Journal of Pharmacology*, v. 616, p. 7–15, 2009.

LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Properties of *Trichomonas vaginalis* grown under chemostat controlled growth conditions. *Genitourinary Medicine*, v. 66, p. 193-199, 1990.

LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Biology of trichomonosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 13, p. 37-45, 2000.

LEHKER, M. W.; ARROYO, R.; ALDERETE, J. F. The Regulation by Iron of the Synthesis of Adhesins and Cytoadherence Levels in the Protozoan *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 174, p. 311-318, 1991.

- 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.
- LINDMARK, D. G.; MÜLLER, M.; SHIO, H. Hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Parasitology*, v. 61, p. 522-554, 1975.
- LINDMARK, D. G.; ECKENRODE, B. L.; HALBERG, L. A.; DINBERGS, I. D. Carbohydrate, energy and hydrogenosomal metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Protozoology*, v. 36, p. 214-216, 1989.
- LINSTEAD, D. Cultivation. In: HONIGBERG, B. M. (Ed.). *Trichomonads Parasitic in Humans*. New York: Springer, 1990. p. 91-111.
- LLOYD, D.; KRISTENSEN, B. Metronidazole inhibition of hydrogen production in vivo in drug-sensitive and resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of General Microbiology*, v. 131, p. 849-853, 1985.
- LÓPEZ, L. B.; BRAGA, M. B. M.; LÓPEZ, J. O.; ARROYO, R.; COSTA E SILVA FILHO, F. Strategies by which some pathogenic trichomonads integrate diverse signals in the decision-making process. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 72, p. 173-186, 2000.
- MACK, S. R.; MÜLLER, M. End products of carbohydrate metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *Comparative Biochemistry Physiology*, v. 67B, p. 213-216, 1980.
- 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, 2002. p. 1-16.
- 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 GRORY, T.; MEYSICK, K. C.; LEMCHUK-FAVEL, L. T.; GARBER, G. E. The interaction of *Lactobacillus acidophilus* and *Trichomonas vaginalis* in vitro. *The Journal of Parasitology*, v. 80, p. 50–54, 1994.
- MEDZHITOV, R.; HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, p. 692-703, 2009.
- 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.
- MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. *Environmental Health Perspectives*, v. 64, p. 199-208, 1985.
- MORENO-BRITO, V.; YÁÑEZ-GÓMEZ, C.; MEZA-CERVANTEZ, P.; AVILA-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. *Cell Microbiology*, v. 7, p. 245-258, 2005.
- MULERO, J. J.; YEUNG, G.; NELKEN, S. T.; FORD, J. E. CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 29, p. 20064–20067, 1999.
- MÜLLER, M. The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology*, v. 139, p. 2879–2889, 1993.

- MÜLLER, M.; LOSSICK, J. G.; GORELL, T. E. *In vitro* susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole and treatment outcome in vaginal trichomoniasis. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 15, p. 17–24, 1988.
- 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.
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*, v. 420, p. 846–852, 2002.
- NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews*, v. 82, p. 1013–1067, 2002.
- OKUMURA, Y. M. C.; BAUM, L. G.; JOHNSON, P. J. Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cellular Microbiology*, v. 10, p. 2078- 2090, 2008.
- OPPENHEIM, J. J.; YANG, D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current Opinion in Immunology*, v. 17, p. 359–365, 2005.
- PAINTLIA, M. K.; KAUR, S.; GUPTA, I.; GANGULY, N. K.; MAHAJAN, R. C.; MALLA, N. Specific IgA response, T-cell subtype and cytokine profile in experimental intravaginal trichomoniasis. *Parasitology Research*, v. 88, p. 338–343, 2002.
- PARK, G. C.; RYU, J. S.; MIN, D. Y. The role of nitric oxide as an effector of macrophage-mediated cytotoxicity against *Trichomonas vaginalis*. *The Korean Journal of Parasitology*, v. 35, p. 189-195, 1997.
- PEREIRA-NEVES, A.; BENCHIMOL, M. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biology of the Cell*, v. 99, p. 87-101, 2007.
- PETERSON, K. M.; ALDERETE, J. F. Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, v. 37, p. 755–762, 1982.

- PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, p. 300-317, 1998.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, v. 50, p. 413-492, 1998.
- RAPAPORT, E.; ZAMECNIK, P. C. Increased incorporation of adenosine into adenosine nucleotide pools in serum-deprived mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, v. 75, p. 1145-1147, 1978.
- RESTA, R.; THOMPSON, L. F. SCID: the role of adenosine deaminase deficiency. *Immunology Today*, v.18, p. 371-374, 1997a.
- RESTA, R.; THOMPSON, L. F. T cell signalling through CD73. *Cell Signalling*, v. 9, p. 131-139, 1997b.
- ROSA, F. W.; BAUM, C.; SHAW, M. Pregnancy outcomes after first-trimester vaginitis drug therapy. *Obstetrics and Gynecology*, v. 69, p. 751-755, 1987.
- 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.

- 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.
- SEONG, S. Y.; MATZINGER, P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*, v. 4, p. 469–478, 2004.
- SHAIO, M. F.; LIN, P. R.; LEE, C. S.; HOU, S. C.; TANG, P.; YANG, K. D. Novel neutrophil-activating factor released by *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, v. 60, p. 4475-4482, 1992.
- 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.
- SINGH, B. N.; HAYES, G. R.; LUCAS, J. J.; SOMMER, U.; VISEUX, N.; MIRGORODSKAYA, E.; TRIFONOVA, R. T.; SASSI, R. R. S.; COSTELLO, C. E.; FICHOROVA, R. N. Structural details and composition of *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan in relevance to the epithelial immune function. *Glycoconjugate Journal*, v. 26, p. 3–17, 2009.
- SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L.; HENNESSEY, T. M. A soluble ecto-ATPase from *Tetrahymena thermophila*: purification and similarity to the membrane-bound ecto-ATPase of smooth muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 337, p. 351–359, 1997.
- SONG H. O.; SHIN, M. H.; AHN, M. H.; MIN, D. Y.; KIM, Y. S.; RYU, J. S. *Trichomonas vaginalis*: reactive oxygen species mediates caspase-3 dependent apoptosis of human neutrophils. *Experimental Parasitology*, v. 118, p. 59-65, 2008.
- SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and Africans. *Emerging Infectious Disease*, v. 7, p. 927-932, 2001.

- TAKEICHI, O.; HAYASHI, M.; TSURUMACHI, T.; MEZAWA, S.; SAITO, T. Cytokine regulation on nitric oxide production in periapical periodontitis. *Journal of Dental Research*, v. 77, p. 2909, 1998.
- 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.
- VAN DER POL, B.; KWOK, C.; PIERRE-LOUIS, B.; RINALDI, A.; SALATA, R. A.; CHEN, P. L.; VAN DE WIJGERT, J.; MIRO, F.; MUGERWA, R.; CHIPATO, T.; MORRISON, C. S. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *The Journal of Infectious Disease*, v. 197, p. 548-554, 2008.
- VASCONCELOS, E. G.; FERREIRA, S. T.; DE CARVALHO, T. M. U.; DE SOUZA, W.; KETTLUN, A. M.; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*—immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 22139-22145, 1996.
- VIIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncologica*, v. 39, p. 71-75, 2000.
- WHEELER, M. A.; SMITH, S. D.; GARCIA-CADENA, G.; NATHAN, C. F.; WEISS, R. M.; SESSA, W. C. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 99, p. 110-116, 1997.



- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. Overview and Estimates, WHO/HIV\_AIDS/2001.02 and WHO/CDS/CSR/EDC/2001.10. World Health Organization, Geneva, 2001.
- XIE, Q. W.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 296, p. 4705-4708, 1994.
- YADAV, M.; DUBEY, M. L.; GUPTA, I.; MALLA, N. Nitric oxide radicals in leucocytes and vaginal washes of *Trichomonas vaginalis* -infected symptomatic and asymptomatic women. *Parasitology*, v. 132, p. 339-343, 2006.
- 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.
- YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1783, p. 673-694, 2006.
- ZARIFFARD, M. R.; HARWANI, S.; NOVAK, R. M.; GRAHAM, P. J.; JI, X; SPEAR, G. T. *Trichomonas vaginalis* infection activates cells through toll-like receptor 4. *Clinical Immunology*, v. 111, p. 103-107, 2004.
- 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.







### III.5.1. Carta de Aprovação do Comitê de Ética da UFRGS

	<b>U F R G S</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	<b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA</b> Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs	
---	--	---	---

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs analisou o projeto:**

**Número:** 19346  
**Título:** Interação entre Trichomonas vaginalis e neutrófilos humanos: análise do sistema purinérgico na produção de interleucina 8


**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

TIANA TASCA - coordenador desde 18/10/2010  
Amanda Piccoli Frasson - Aluno de Mestrado desde 18/10/2010  
CAMILA DORNELES DA SILVA - Aluno de Graduação desde 18/10/2010

**Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs aprovou o mesmo, em reunião realizada em 25/11/2010 - Sala de Reuniões do 3º andar da PROPLAN, 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, 25 de Novembro de 2010

  
JOSE ARTUR BOGO CHIES  
Coordenador da comissão de ética

1

### III.5.2. Licenças para Uso das Figuras

#### ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 09, 2011

This is a License Agreement between Tiana Tasca ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Tiana Tasca
Customer address	Avenida Ipiranga, 2752 Porto Alegre, other 90610000
License number	2604911318417
License date	Feb 09, 2011
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Molecular and Biochemical Parasitology
Licensed content title	Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in <i>Trichomonas vaginalis</i>
Licensed content author	Narsimha Rao Munagala, Ching C. Wang
Licensed content date	3 April 2003
Licensed content volume number	127
Licensed content issue number	2
Number of pages	7
Start Page	143
End Page	149
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	Sistema purinérgico de <i>Trichomonas vaginalis</i> : envolvimento da ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase e da ecto-5'-nucleotidase na produção de adenosina e na secreção de óxido nítrico por neutrófilos
Expected completion date	Mar 2011
Estimated size (number of pages)	150
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD



**Title:** P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease  
**Author:** Baljit S. Khakh and R. Alan North  
**Publication:** Nature  
**Publisher:** Nature Publishing Group  
**Date:** Aug 3, 2006  
 Copyright © 2006, Nature Publishing Group

Logged in as:  
 Tiana Tasca  
 Account #:  
 3000381948

LOGOUT

### Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Tiana Tasca ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	2607790481623
License date	Feb 14, 2011
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature
Licensed content title	P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease
Licensed content author	Baljit S. Khakh and R. Alan North
Licensed content date	Aug 3, 2006
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Volume number	442
Issue number	7102
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 1
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	Sistema purinérgico de Trichomonas vaginalis: envolvimento da ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase e da ecto-5'-nucleotidase na produção de adenosina e na secreção de óxido nítrico por neutrófilos
Expected completion date	Mar 2011
Estimated size (number of pages)	150
Total	0.00 USD

ORDER MORE...

CLOSE WINDOW



**Title:** Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature  
**Author:** Herbert Zimmermann  
**Publication:** Drug Development Research  
**Publisher:** John Wiley and Sons  
**Date:** Jan 1, 2001  
 Copyright © 2001, Copyright © 2001 Wiley-Liss, Inc.

Logged in as:  
 Tiana Tasca  
 Account #:  
 3000381948

[LOGOUT](#)

**Order Completed**

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Tiana Tasca ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by John Wiley and Sons, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	2607581416399
License date	Feb 14, 2011
Licensed content publisher	John Wiley and Sons
Licensed content publication	Drug Development Research
Licensed content title	Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature
Licensed content author	Herbert Zimmermann
Licensed content date	Jan 1, 2001
Start page	44
End page	56
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1
Will you be translating?	No
Order reference number	
Total	0.00 USD

[ORDER MORE...](#) [CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2011 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#).  
 Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)

