

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

Estudo da Expressão Gênica das Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases  
(E-NTPDases) em *Trichomonas vaginalis* e Participação da Sinalização  
Purinérgica na Relação Parasito-Hospedeiro

AMANDA PICCOLI FRASSON

PORTO ALEGRE, 2015



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

Estudo da Expressão Gênica das Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases  
(E-NTPDases) em *Trichomonas vaginalis* e Participação da Sinalização  
Purinérgica na Relação Parasito-Hospedeiro

Tese apresentada por **Amanda Piccoli Frasson**  
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em  
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dr. Tiana Tasca

Porto Alegre, 2015

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31/03/2015 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Carla Denise Bonan

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Márcia Rosângela Winck

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dr. Marilise Brittes Rott

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Piccoli Frasson, Amanda

Estudo da Expressão Gênica das Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases (E-NTPDases) em *Trichomonas vaginalis* e Participação da Sinalização Purinérgica na Relação Parasito-Hospedeiro / Amanda Piccoli Frasson. -- 2015.

181 f.

Orientadora: Tiana Tasca.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. *Trichomonas vaginalis*. 2. Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases . 3. Ectonucleotidases. 4. Expressão gênica. 5. Parasito-Hospedeiro. I. Tasca, Tiana, orient. II. Título.

Este estudo foi desenvolvido nos Laboratórios de Pesquisa em Parasitologia e de Cultivo Celular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES durante todo o desenvolvimento da tese.



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, instituição que me acolheu ao longo de toda minha formação acadêmica e da qual muito me orgulho em fazer parte, pelos conhecimentos transmitidos, oportunidades oferecidas e suporte científico.

À Faculdade de Farmácia, seus professores e funcionários, pela convivência diária, pelas amizades que construí e por todos os ensinamentos durante esses anos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr. Tiana Tasca, pela acolhida há quase sete anos atrás e pela oportunidade de participar desse extraordinário grupo de pesquisa. Agradeço à atenção, ao tempo despendido e pela presença em todos os momentos dessa caminhada. Obrigada pelo incentivo constante, pelas frutíferas discussões e por ser fundamental no meu crescimento científico. Agradeço aos exemplos de profissionalismo, dedicação e amor ao trabalho. O meu muito obrigada pela amizade construída, pelo carinho e por acreditar em mim.

Aos meus queridos colegas e amigos do Laboratório de Pesquisa em Parasitologia – Camila, Dariana, Débora, Fernanda, Graziela, Lúcia, Márcia, Muriel, Nicolas, Odelta e Patrícia. Agradeço a oportunidade de conviver com vocês, compartilhando os momentos de muito trabalho, de intenso estudo, mas também de muita descontração e alegria. Obrigada pela troca de conhecimentos, pelas discussões, pelas contribuições no desenvolvimento desta tese e pela amizade. Um agradecimento especial à Lúcia, Odelta e Camila que foram fundamentais na construção deste estudo.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Alexandre Macedo, pela colaboração, pelos auxílios, pela convivência e amizade.

Aos grupos de pesquisa do Prof. Dr. Jean Sevigny (ULaval, Canada) e da Prof. Dr<sup>a</sup>. Raina Fichorova (Harvard, EUA), pela oportunidade de conviver com grandes pesquisadores, conhecer outras realidades científicas, vivenciar novas culturas e expandir meu conhecimento.

Aos colaboradores que participaram desta tese, especialmente ao Gustavo K. Goelzer, pela dedicação, parceria e auxílio.

Aos demais colegas da Faculdade de Farmácia, especialmente aos técnicos do Laboratório de Cultivo Celular, Camilo D'amore e Leonardo Bodo, pela disponibilidade e apoio.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e à CAPES pelos auxílios financeiros e pela bolsa de doutorado concedida.

Aos meus queridos amigos, pelo incentivo, pelo companheirismo, pelas palavras de apoio e pelos momentos de descontração. Um agradecimento especial às amigas que conheci na Graduação e que me acompanharam nas fases de Mestrado e Doutorado - Amanda, Andrea, Maiara, Marcella e Thatiana - pela parceria ao longo desses anos e pelas longas conversas.

Ao meu namorado Bruno, pelo incentivo constante, pela compreensão, pela paciência, por me apoiar sempre e me transmitir muita força. Obrigada pelo amor e companheirismo. Agradeço à família do Bruno, pelo carinho, incentivo e apoio.

À minha irmã Luana, pela atenção, pelo incentivo, pelo exemplo de profissional, pelo carinho e amor.

Aos meus pais, Clovis e Jocelia, pelo suporte, pela paciência, pela infinita dedicação e amor. Obrigada por estarem sempre ao meu lado incentivando minhas decisões. Agradeço os valores transmitidos e o apoio sempre incondicional.



*“The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them.”*

William Lawrence Bragg



## RESUMO

*Trichomonas vaginalis* é o agente etiológico da doença sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo, sendo registrados aproximadamente 276 milhões de novos casos de tricomonose a cada ano. O estabelecimento da infecção se deve principalmente à capacidade de adesão do parasito às células epiteliais vaginais, cervicais ou de próstata, seguida pela intensa reação inflamatória, resultado da infiltração de neutrófilos no sítio da infecção. Nucleotídeos e nucleosídeos, especialmente ATP e adenosina, são liberados para o espaço extracelular por células em situações de estresse ou injúria tecidual e desenvolvem seus efeitos sinalizadores através da ativação de purinoceptores. Ainda, as ectonucleotidases, NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, são capazes de hidrolisar os nucleotídeos gerando adenosina e finalmente, a enzima adenosina deaminase (ADA) é responsável pela conversão de adenosina em inosina. A expressão gênica de cinco NTPDases putativas presentes no genoma de *T. vaginalis* foram investigadas, assim como o envolvimento da sinalização purinérgica na relação parasito-hospedeiro. Nossos resultados mostraram que diferentes isolados de *T. vaginalis* expressam os genes *TvNTPDase1*, 2, 3, 4 e 5, sendo observado o maior número de transcritos para *TvNTPDase1*, 2 e 4. A sequência preditiva de aminoácidos revelou a presença das cinco regiões conservadas da apirase, domínios transmembrana, sítios de fosforilação, peptídeos sinais e os prováveis sítios ativos da enzima. A análise filogenética demonstrou maior similaridade das *TvNTPDases* com as formas intracelulares da enzima, como as NTPDases 4 e 7 humanas e a de *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, a restrição de soro promoveu aumento significativo da atividade da NTPDase de *T. vaginalis*, no entanto sem corresponder com o aumento de expressão gênica de determinada(s) sequência(s). Quanto à participação da sinalização purinérgica na resposta inflamatória de células do hospedeiro frente ao parasito, foram utilizados como modelos celulares as células epiteliais vaginais (HMVII), cervicais (HeLa) e neutrófilos humanos. As linhagens HMVII e HeLa mostraram expressar todos os subtipos de receptores P1, P2X e P2Y e

os diferentes isolados de *T. vaginalis*, que foram cocultivados com as células, mostraram hidrolisar eficientemente os nucleotídeos ATP, ADP e AMP. Ainda, o isolado clínico fresco TV-LACM6 foi o único a apresentar elevada citotoxicidade frente às células epiteliais vaginais e cervicais, no entanto não foi detectado aumento da liberação de ATP pelas células após o cocultivo, provavelmente devido à alta atividade da enzima NTPDase observada nesse isolado. Os trofozoítos de *T. vaginalis* não foram capazes de aumentar a produção de IL-8 e IL-6 pelas linhagens HMVII e HeLa, e apenas os isolados ATCC30236 e TV-LACM6 causaram aumento na secreção da citocina MIP-3 $\alpha$  pelas células epiteliais cervicais. Finalmente, o nucleotídeo ATP e o nucleosídeo adenosina não modularam a produção dos mediadores inflamatórios investigados. Em relação aos neutrófilos, estes mostraram aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e IL-8 após incubação com os trofozoítos de *T. vaginalis*. Os nucleotídeos e nucleosídeos da adenina e guanina não produziram efeito na produção de ERO e IL-8; no entanto, quando o nucleosídeo adenosina foi incubado junto com o inibidor da enzima ADA (EHNA) observou-se uma redução significativa da produção de ERO e IL-8 pelos neutrófilos, devido à inibição da ADA e conseqüentemente, ao aumento da concentração de adenosina disponível no meio extracelular. Os nossos resultados indicaram a ativação do receptor A1 dos neutrófilos nessa condição. O conjunto de dados aqui obtidos contribuiu para uma melhor caracterização da família de enzimas NTPDases de *T. vaginalis* assim como para um maior conhecimento acerca da influência da sinalização purinérgica na relação parasito-hospedeiro.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*, sinalização purinérgica, NTPDase, células epiteliais vaginais, células epiteliais cervicais, neutrófilos, adenosina.

## ABSTRACT

### Gene Expression of Five Putative Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases (NTPDases) in *Trichomonas vaginalis* and Participation of Purinergic Signaling on Host-Parasite Relationship

*Trichomonas vaginalis* is the agent of the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide, causing 276.4 million new cases a year. The establishment of the infection is closely related to the parasite ability to adhere to vaginal, cervical and prostate epithelial cells, followed by an intense inflammatory response as result of neutrophil infiltration. Nucleotides and nucleosides, mainly ATP and adenosine, are released into the extracellular space by cells under stress or injury and they exert their signaling effects through activation of the purinoceptors. Moreover, the ectonucleotidases, NTPDase and ecto-5'-nucleotidase, are capable of hydrolyzing the nucleotides producing adenosine and finally, the adenosine deaminase (ADA) is responsible for the conversion of adenosine to inosine. We investigated the gene expression of five putative NTPDases found in *T. vaginalis* genome as well as the involvement of purinergic signaling on the host-parasite relationship. Our results showed that different *T. vaginalis* isolates are able to express *TvNTPDase1*, *2*, *3*, *4* and *5* and that *TvNTPDase1*, *2* and *4* are the most expressed genes. Predictive amino acid sequence revealed the presence of the five apyrase conserved regions, transmembrane domains, phosphorylation sites, signal peptides and the active sites. Phylogenetic analysis showed that *TvNTPDases* share more similarity with the intracellular enzymes, such as human NTPDase 4 and 7 and *Saccharomyces cerevisiae* NTPDase. In addition, the serum limitation caused a significant increase in NTPDase activity, but without association with the gene expression of a specific *TvNTPDase* sequence. Regarding the participation of purinergic signaling on the inflammatory responses against the parasite, the vaginal (HMVII) and cervical (HeLa) epithelial cells and the human neutrophils were used as cellular models. HMVII and HeLa cell lines showed

to express all subtypes of P1, P2X and P2Y receptors and the different *T. vaginalis* isolates, which were co-cultured with the cells, showed to hydrolyze efficiently ATP, ADP and AMP. Furthermore, only the fresh clinical isolate, TV-LACM6, caused a profound cytotoxicity against the vaginal and cervical epithelial cells. Interestingly, it was not detected an increase in ATP release by the cells after cocultivation, probably due to the high NTPDase activity displayed by TV-LACM6 isolate. The *T. vaginalis* trophozoites were not able to increase the production of IL-8 and IL-6 by HMVII and HeLa cells and only ATCC30236 and TV-LACM6 isolates enhanced MIP-3 $\alpha$  secretion by the cervical epithelial cells. Finally, neither ATP nor adenosine has modulated the production of the inflammatory mediators here investigated. Considering the neutrophils, *T. vaginalis* stimulated the production of reactive oxygen species (ROS) and IL-8 by these immune cells and both adenine as guanine nucleotides and nucleosides did not cause any effect on ROS and IL-8 levels. However, when adenosine was incubated with an ADA inhibitor (EHNA) we observed a significant reduction of ROS and IL-8 production by neutrophils, due to inhibition of ADA with a subsequent increase of adenosine concentration in the extracellular milieu. . Our results suggested the participation of A1 receptor in this condition. The data set obtained in this study contributed to the characterization of *T. vaginalis* NTPDases family as well as to a better understanding of the influence of purinergic signaling on host-parasite relationship.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, purinergic signaling, NTPDase, vaginal epithelial cells, cervical epithelial cells, neutrophils, adenosine.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- DST: Doença Sexualmente Transmissível
- PNP: Purina Nucleosídeo Fosforilase
- PNK: Purina Nucleosídeo Cinase
- MudPit: Identificação Multidimensional de Proteínas
- MS: Espectrometria de Massas
- TVVs: Tricomonasvírus
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- FDA: *Food and Drug Administration*
- PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
- RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa
- qRT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa Quantitativa
- CEVs: Células epiteliais vaginais
- TvLPG: Lipofosfoliglicano de *Trichomonas vaginalis*
- TLR: *Toll-like receptor*
- IL-: Interleucina
- MIP-3 $\alpha$ : Proteína Inflamatória de Macrófagos 3- $\alpha$
- ERO: Espécies Reativas de Oxigênio
- ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio
- ACRs: Regiões Conservadas da Apirase
- DAMPs: Padrões Moleculares Associados ao Dano
- E-NTPDase: Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
- ADA: Adenosina Deaminase
- HIBS: *Heat-Inactivated Bovine Serum*
- PMNL: Polimorfonuclear





## SUMÁRIO

### PARTE I

<b>I. Introdução.....</b>	<b>14</b>
I.1. <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	15
I.1.1. Aspectos Morfológicos e Metabólicos.....	15
I.1.2. Aspectos Genéticos e Moleculares.....	18
I.2. Tricomonose.....	19
I. 3. Relação Parasito-Hospedeiro.....	23
I. 3. 1. Mecanismos de Patogenicidade.....	23
I. 3. 2. Imunidade.....	25
I. 4. Sistema Purinérgico.....	27
<b>I.5. Objetivos.....</b>	<b>37</b>

### PARTE II

<b>II. Artigo Científicos.....</b>	<b>40</b>
II.1. CAPÍTULO 1 - <u>Amanda Piccoli Frasson</u> , Odelta dos Santos, Lúcia Collares Meirelles, Alexandre José Macedo, Tiana Tasca. Five Putative Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases (NTPDases) genes are expressed in <i>Trichomonas vaginalis</i> . Manuscrito submetido ao periódico Parasitology Research.....	41
II.2. CAPÍTULO 2 - <u>Amanda Piccoli Frasson</u> , Lúcia Collares Meirelles, Gustavo Krumel Goelzer, Solange Cristina Garcia, Tiana Tasca. Participation of Purinergic Signaling on <i>Trichomonas vaginalis</i> -Host Relationship. Manuscrito a ser submetido ao periódico Microbes and Infection.....	70

II.3. CAPÍTULO 3 - <u>Amanda Piccoli Frasson</u> , Camila Braz Menezes, Gustavo Krumel Goelzer, Solange Cristina Garcia, Alexandre José Macedo, Tiana Tasca. Increased Bioavailability of Adenosine due to Adenosine Deaminase Inhibition Leads to Reduction of Reactive Oxygen Species (ROS) and Interleukin-8 (IL-8) Production by Neutrophils Stimulated with <i>Trichomonas vaginalis</i> . Manuscrito a ser submetido ao periódico Purinergic Signalling.....	99
--	----

### PARTE III

<b>III. 1. Discussão Geral</b> .....	129
<b>III. 2. Conclusões Gerais</b> .....	142
<b>III. 3. Perspectivas</b> .....	145
<b>III. 4. Referências</b> .....	147
<b>III. 5. Anexo</b> .....	158

# **PARTE I**





## I. Introdução



## I.1. *Trichomonas vaginalis*

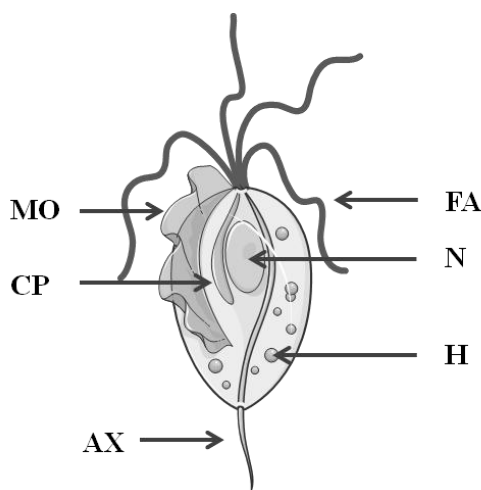
### I.1.1. Aspectos Morfológicos e Metabólicos

*Trichomonas vaginalis* é um protozoário flagelado parasita do trato urogenital humano e agente etiológico da doença sexualmente transmissível (DST) tricomonose. O organismo foi descrito pela primeira vez por Donné, em 1836, ao isolá-lo de uma paciente com vaginite. O protozoário é membro da classe Parabasalia, a qual pertence ao subgrupo Excavata, uma categoria filogenética de eucariotos unicelulares que também inclui parasitos dos gêneros *Trypanosoma* e *Giardia* (CAVALIER-SMITH, 2002).

O patógeno *T. vaginalis* trata-se do tricomonadídeo mais amplamente estudado e pode ser cultivado tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas. O parasito, que apresenta apenas o estágio trofozoítico (Figura 1), tende a alterar sua morfologia de acordo com as condições ambientais em que se encontra; em culturas axênicas sua forma é tipicamente piriforme e uniforme, enquanto *in vivo* apresenta-se amebóide aderido às células epiteliais vaginais (ARROYO *et al.*, 1993). O trofozoíto, cujo tamanho médio é de 10 µm de comprimento e 7,0 µm de largura, possui cinco flagelos sendo quatro deles localizados na região anterior, enquanto o quinto se projeta para a região posterior fazendo contato com o corpo celular e formando a membrana ondulante. Os flagelos, junto com a membrana ondulante, são os responsáveis pela característica motilidade dos trofozoítos (BENCHIMOL, 2004).

Uma importante organela que merece destaque em *T. vaginalis* é o hidrogenossomo. Considerando a ausência de mitocôndrias e peroxissomos, os hidrogenossomos são estruturas únicas, envoltas por uma dupla membrana, que apresentam elevada atividade enzimática e assumem a função de síntese de ATP. Estas organelas não contêm citocromos, enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e DNA, mas degradam carboidratos e produzem hidrogênio molecular através de um grupo de

proteína-[Fe-S], ferredoxinas e [Fe]-hidrogenases (MÜLLER, 1993; KULDA, 1999; SUTAK *et al.*, 2004). O fato do parasito não apresentar mitocôndrias o torna um importante modelo para estudos fisiológicos e de biologia celular.



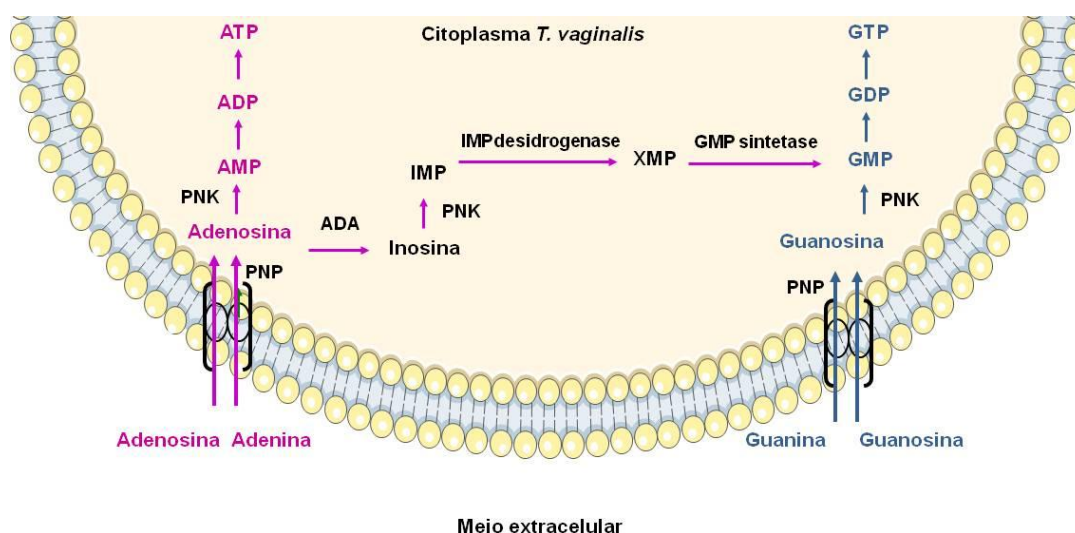
**Figura 1.** Aspectos morfológicos de *Trichomonas vaginalis*. AX (axóstilo), CP (corpo parabasal), FA (flagelo anterior livre), H (hidrogenossomo), MO (membrana ondulante), N (núcleo).

Em relação ao metabolismo e à aquisição de nutrientes, *T. vaginalis* revela características distintas de outros eucariotos e mostra-se dependente de um grande número de metabólitos pré-formados, demonstrando a ausência de importantes vias biossintéticas. O parasito é incapaz de sintetizar *de novo* diversas macromoléculas, particularmente, purinas, pirimidinas e lipídios, incluindo o colesterol. Nestes casos, os nutrientes são adquiridos a partir de secreções vaginais e através da fagocitose de células bacterianas e do hospedeiro (PEREIRA-NEVES e BENCHIMOL, 2007).

Quanto ao metabolismo dos nucleotídeos, *T. vaginalis* é auxotrófico de purinas e pirimidinas dependendo assim, das vias de salvação. A salvação de pirimidinas é mediada por fosforibosiltransferases e nucleosídeo cinases, enquanto no caso das purinas atuam fosforilases e cinases (HEYWORTH *et al.*, 1982; 1984). Mais especificamente, a via de salvação das purinas consiste em uma rota simplificada de duas enzimas: a purina nucleosídeo fosforilase (PNP, do inglês *Purine Nucleoside Phosphorylase*), a qual catalisa a interconversão entre bases púricas e nucleosídeos, e a



purina nucleosídeo cinase (PNK, do inglês *Purine Nucleoside Kinase*) que converte nucleosídeos em nucleotídeos (Figura 2). O parasito depende da ação sequencial destas duas enzimas para incorporar adenina ou guanina ao *pool* de nucleotídeos, ou ainda, no caso de disponibilidade de adenosina ou guanosina exógena, estas podem ser convertidas diretamente aos seus nucleotídeos pela ação da PNK somente. Ainda, *T. vaginalis* não incorpora hipoxantina ou inosina aos seus nucleotídeos e de forma importante, Munagala e Wang (2003) demonstraram que somente adenina, mas não guanina ou hipoxantina, é capaz de suportar o crescimento *in vitro* dos parasitos. Esta observação leva à identificação de um esquema de salvação de purinas onde a adenina externa pode ser convertida tanto a nucleotídeos da adenina ou guanina através de uma prévia conversão à adenosina. Com base nesse estudo, a adenosina pode ser considerada o precursor de todos os nucleotídeos púricos em *T. vaginalis*. A recaptção dos nucleosídeos adenosina, guanosina e uridina é mediada por dois distintos transportadores; enquanto o primeiro apresenta um sítio de ligação para nucleosídeos pirimídicos e adenosina, e ainda um sítio específico para nucleosídeos púricos, o segundo carreador 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*. PNP: purina nucleosídeo fosforilase, PNK: purina nucleosídeo cinase, ADA: adenosina deaminase. Adaptado de Munagala e Wang, 2003.

### I.1.2. Aspectos Genéticos e Moleculares

Desde a publicação do genoma de *T. vaginalis* (CARLTON *et al.*, 2007), uma nova abordagem tem sido possível acerca de tópicos essenciais do parasito como, diversidade genética, estrutura de populações, mecanismos de patogenicidade e interações parasito-microbiota. A sequência genômica, obtida a partir do isolado G3 de *T. vaginalis*, mostra-se altamente fragmentada, com aproximadamente 160 Mb – genoma este muito maior que de outros conhecidos protozoários como *Entamoeba* (~20 Mb), *Plasmodium* (~25 Mb) e *Toxoplasma* (~63 Mb) (CONRAD *et al.*, 2013). A anotação original identificou aproximadamente 60.000 potenciais genes codificadores de proteínas, os quais reduziram para aproximadamente 46.000 devido à retirada de genes fragmentados (SMITH e JOHNSON, 2011). O genoma ainda contém 1100 genes de RNA ribossomais e pelo menos 14.390 *open reading frames* (ORFs) transponíveis ou virais organizados em seis cromossomos (CARLTON *et al.*, 2007). A grande redundância de genes anotados é justificada devido a desconhecidas duplicações ocorridas no genoma. Aproximadamente 65% deste é composto por famílias altamente homogêneas e repetitivas, incluindo elementos vírus-like, transposon-like e retrotransposon-like. Além disso, a presença de famílias gênicas expandidas, tais como: 927 genes para proteínas cinases, 328 para GTPases e 48 para cisteína peptidases, colaboram para a grande quantidade de genes codificadores de proteínas (SMITH e JOHNSON, 2011). Cabe ainda aqui salientar que a expansão de certas famílias gênicas não tem sido considerada acontecer de maneira randômica, mas sim, baseada nos genes que parecem favorecer a sobrevivência de *T. vaginalis* (CARLTON *et al.*, 2007).

Comparando-se o número de publicações e projetos relacionados à genômica, proteômica e transcriptômica de *T. vaginalis* com outros parasitos, como os do gênero *Plasmodium*, por exemplo, observa-se uma grande escassez de estudos. Entretanto, devido a uma maior facilidade de acesso a técnicas de sequenciamento, as análises transcriptômicas e proteômicas têm sido crescentes e provêm valiosas informações

sobre os perfis de expressão de milhares de genes e proteínas (CONRAD *et al.*, 2013; LAND e WRISCHNIK, 2013). O emprego de tecnologias como a identificação multidimensional de proteínas (MuDPiT), espectrometria de massas (MS) e eletroforese em gel 2D combinada com MS, possibilita a realização de importantes estudos proteômicos que contribuem, por exemplo, para o aumento de confirmações de proteínas hipotéticas - as quais constituem aproximadamente 86% das proteínas preditas a serem codificadas pelo genoma de *T. vaginalis*. Além disso, análises proteômicas permitem a investigação de diferenças entre as infecções presentes em mulheres e homens, assim como, entre aquelas sintomáticas e assintomáticas (CONRAD *et al.*, 2013).

Estudos moleculares também têm sido conduzidos com o objetivo de identificar diversidade genética, estrutura de populações e traçar correlações entre fenótipos clínicos relevantes e aspectos genéticos (LAND e WRISCHNIK, 2013). Neste sentido, um extenso painel de marcadores moleculares (microssatélites e SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) foi desenvolvido para avaliar variação gênica e, através destas técnicas, tem-se sugerido a existência de dois “tipos” gênicos de *T. vaginalis*. Os tipos 1 e 2 parecem estar distribuídos em proporções semelhantes no mundo, mas apresentam diferenças significativas em relação à presença ou não de vírus de fita dupla de RNA (TVVs) e à sensibilidade ao fármaco metronidazol (CORNELIUS *et al.*, 2012). Desta maneira, estes marcadores podem ser utilizados em estudos epidemiológicos para diferenciar novas infecções, re-infecções e infecções com genótipos mistos.

## I. 2. Tricomonose

A tricomonose, infecção causada por *T. vaginalis*, trata-se da doença sexualmente transmitida (DST) de origem não viral mais frequente no mundo. Os dados mais recentes publicados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam uma incidência de 276,4 milhões de novos casos por ano, o que representa mais do que

a soma dos casos reportados de infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* (105,7 milhões), *Neisseria gonorrhoeae* (106,1 milhões) e sífilis (10,6 milhões) no mesmo período (WHO, 2012). Ao contrário de outras DSTs que predominantemente ocorrem em adolescentes e jovens adultos, a prevalência de tricomonose é uniformemente distribuída entre mulheres e homens sexualmente ativos de todas as faixas etárias (MUSNY e SCHWEBKE, 2013).

O parasito *T. vaginalis* afeta o epitélio escamoso do trato genital e provoca maiores consequências em mulheres (LEHKER e ALDERETE, 2000). A infecção em pacientes do sexo feminino apresenta um amplo espectro de sintomas, podendo variar de um quadro assintomático (entre 25% e 80% dos casos) até um estágio de vaginite aguda. Os sinais inflamatórios clássicos são: corrimento vaginal (tipicamente espumoso de coloração amarelo-esverdeada), irritação, prurido vulvar, edema e eritema vaginal. Menos frequentemente também se relata dor abdominal, disúria e a presença de pequenos pontos hemorrágicos na mucosa da ectocérvice, sinal que recebe o nome de *colpitis macularis* ou cérvix com aspecto de morango (PETRIN *et al.*, 1998; SCHWEBKE e BURGESS, 2004; POOLE e MCCLELLAND, 2013).

Diferentemente do acima descrito para mulheres, o panorama da infecção no sexo masculino é menos caracterizado. Em geral, a infecção é autolimitada e assintomática, tornando os homens potenciais carreadores do parasito. Entretanto, sabe-se que a tricomonose é uma reconhecida causa de uretrite não gonocócica, que pode vir acompanhada de secreção clara ou mucopurulenta, disúria e leve sensação de prurido ou queimação após a relação sexual (PETRIN *et al.*, 1998). Além disso, existem relatos de associação com prostatite, epididimite e infertilidade (KRIEGER *et al.*, 1993).

Além dos sinais e sintomas aqui já descritos, a tricomonose é considerada um importante problema de saúde pública em virtude das complicações a ela relacionadas. Endometrite, adnexite, piossalpinge e associação positiva com vaginose bacteriana são algumas das comorbidades ligadas à infecção por *T. vaginalis* (FICHOROVA, 2009).

Além disso, a tricomonose também pode implicar em consequências mais graves, 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). Recentemente, foi demonstrado que a tricomonose também está associada a tipos de câncer de próstata agressivos (SUTCLIFFE, 2010). De maneira muito relevante, a doença também atua como um cofator para transmissão e aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Estudos demonstram que a tricomonose aumenta em duas vezes o risco de transmissão do vírus (SORVILLO *et al.*, 2001) e ainda, que 23% das infecções por HIV em mulheres são diretamente atribuídas ao *T. vaginalis* (QUINLIVAN *et al.*, 2012). Diversos são os possíveis mecanismos responsáveis por esse aumento na suscetibilidade ao HIV, incluindo as alterações causadas pelo processo inflamatório, a ruptura de barreiras mecânicas e o comprometimento das respostas imunes. A tricomonose geralmente desencadeia uma agressiva resposta celular local com inflamação do epitélio vaginal, exocérvice ou uretra. Também promove a alteração da microbiota e do pH normal, produzindo um ambiente propício para o vírus atravessar a mucosa e o epitélio cervicovaginal, e finalmente infectar o sistema imune do hospedeiro (KISSINGER e ADAMSKI, 2013).

Apesar da infecção por *T. vaginalis* apresentar uma ampla variedade de sintomas, estes são semelhantes aos de outras DSTs e por isso, não podem ser usados para o diagnóstico definitivo. Assim, o diagnóstico laboratorial é fundamental para a escolha do tratamento adequado e para o controle da infecção (PETRIN *et al.*, 1998). O método mais frequentemente utilizado é o exame microscópico a fresco realizado a partir de secreção vaginal ou uretral, no entanto, a sensibilidade do teste é de apenas 60% e pode ainda ser menor no caso de pacientes assintomáticos (SCHWEBKE e BURGESS, 2004; MUSNY e SCHWEBKE, 2013). O padrão ouro para o diagnóstico é o método cultural, o qual requer apenas 300 - 500 tricomonas/ml para o inóculo inicial e encontra-se comercialmente disponível (PETRIN *et al.*, 1998). Outras técnicas

diagnósticas têm sido desenvolvidas para detectar o parasito, como ensaios imunoenzimáticos e testes de amplificação de ácidos nucleicos. Diversos testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido validados em pacientes sintomáticos e assintomáticos apresentando alta sensibilidade e especificidade. Além destas vantagens, estes ensaios também possibilitam o uso de múltiplas amostras incluindo urina, swabs de raspados vaginais e endocervicais (HOBBS e SEÑA, 2013).

O tratamento da tricomonose é baseado no uso de fármacos do grupo dos 5-nitroimidazóis desde a década de 1960. Ainda hoje, as duas opções terapêuticas de escolha e aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*, USA) são pertencentes a este grupo: o metronidazol e o tinidazol (Figura 3). O metronidazol é um composto com um grupamento nitro na quinta posição do anel imidazólico, derivado do antibiótico azitromicina (HELMS *et al.*, 2008; HARP e CHOWDHURY, 2011). Como uma molécula inativa, o metronidazol penetra no parasito através de difusão passiva e é então ativado nos hidrogenossomos; o grupamento nitro é reduzido anaerobicamente pela enzima piruvato-ferredoxina óxido redutase (PFOR) e os radicais nitro formados são citotóxicos, levando à quebra das fitas de DNA e consequentemente à morte dos trofozoítos (LLOYD e KRISTENSEN, 1985; SECOR, 2012). O tinidazol pertence à segunda geração dos 5-nitroimidazóis e exibe uma maior capacidade de penetrar no trato reprodutivo masculino, além de causar menos efeitos adversos do que o metronidazol. Entretanto, devido à estrutura química semelhante dos dois compostos e à falta de outros recursos terapêuticos, o tratamento torna-se bastante difícil em casos de isolados resistentes aos 5-nitroimidazóis (HARP e CHOWDHURY, 2011; SECOR, 2012).

Infelizmente, a problemática acerca de isolados resistentes aos 5-nitroimidazóis é crescente, atingindo cerca de 9,6% dos casos reportados de tricomonose (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). Os mecanismos de resistência ainda não estão claramente elucidados, mas parecem estar relacionados a uma diminuição ou ausência da atividade e expressão das enzimas piruvato-ferredoxina óxido redutase e hidrogenase (KULDA, 1999). Paralelo ao problema da resistência encontram-se os



mimetismo molecular com proteínas do hospedeiro (FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012).

A citoaderência do parasito à mucosa do trato urogenital é um pré-requisito para o estabelecimento e manutenção da infecção. Este processo é bastante complexo e envolve moléculas de superfície como: adesinas, glicoconjugados, proteínas do citoesqueleto, receptores para as proteínas da matriz extracelular (laminina, fibronectina e colágeno) e sinais de tradução (FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012). Um dos mais bem estudados componentes da membrana do parasito que parece mediar a adesão é o lipofosfoglicano (TvLPG). O TvLPG é o componente mais abundante do glicocálix de *T. vaginalis* e promove a interação parasito-VECs através da ligação ao receptor galectina-1, o único identificado nas células humanas. Parasitos mutantes, deficientes na glicosilação do TvLPG, mostraram reduzida citoaderência e citotoxicidade às células cervicais (OKUMURA *et al.*, 2008; RYAN *et al.*, 2011). As adesinas - AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23 - são proteínas antigênicas localizadas na superfície de *T. vaginalis* que também parecem atuar na citoaderência (GARCIA *et al.*, 2003; KUCKNOOR *et al.*, 2007).

Após a aderência, a citotoxicidade é o próximo passo no processo de citopatogenicidade. Este mecanismo envolve uma cascata de eventos resultando em citólise, fagocitose e desintegração das monocamadas celulares. Algumas moléculas secretadas também são responsáveis pelos efeitos citolíticos independentes de contato, entre elas estão o TVF, um fator liberado pelo parasito que induz um progressivo arredondamento e aglomeração das células alvo (LUSHBAUGH *et al.*, 1989), e o CDF (do inglês, *Cell-Detaching Factor*) que é uma glicoproteína responsável pelo destacamento das CEVs (GARBER e LEMCHUK-FAVEL, 1990).



### I. 3. 2. Imunidade

A infecção por *T. vaginalis* não produz uma efetiva imunidade permanente, o que torna a tricomonose bastante recorrente e a resposta imune inata muito importante (FICHOROVA, 2009). A manutenção de um microambiente normal e saudável no trato genital envolve interações mediadas por TLRs (do inglês, *Toll-like receptors*) entre o epitélio cervical, a mucosa vaginal e a microbiota genital, além da indução de uma variedade de citocinas e fatores imunes inatos (THURMAN e DONCEL, 2011).

Como anteriormente mencionado, o TvLPG auxilia na adesão do parasito às CEVs, e logo após esta aderência, promove uma resposta inflamatória específica e seletiva acompanhada pelo aumento da secreção de interleucina-8 (IL-8), interleucina-6 (IL-6) e proteína inflamatória 3 $\alpha$  de macrófagos (MIP-3 $\alpha$ ) pelas células epiteliais vaginais e cervicais (FICHOROVA *et al.*, 2006). Outros componentes de *T. vaginalis* que promovem uma importante modulação imune são os chamados exossomos. Um recente estudo mostrou que os parasitos são capazes de produzir e secretar estas microvesículas com propriedades físicas e químicas muito similares às dos exossomos de mamíferos (TWU *et al.*, 2013), os quais já foram demonstrados atuar na comunicação intercelular, na modulação imune e na manutenção de metástase tumoral (PANT *et al.*, 2012). Os exossomos de *T. vaginalis* se fundem, transmitem seus conteúdos às células do hospedeiro e finalmente, modulam as respostas imunes através da indução da secreção de IL-8 e IL-6 pelas células epiteliais cervicais (TWU *et al.*, 2013).

Um recente estudo também demonstrou o papel dos Trichomonasvirus na modulação das respostas imunes na tricomonose (FICHOROVA *et al.*, 2013). Pelo menos metade dos isolados clínicos de *T. vaginalis* carregam vírus específicos de RNA de fita dupla (TVVs) e, apesar destes endossimbiontes não serem citopáticos ao protozoário, podem contribuir para a adaptação e virulência ao hospedeiro humano (WANG e WANG, 1991). Fichorova *et al.* (2013) mostraram que os vírus e seus produtos gênicos são capazes de sensibilizar as CEVs através de receptores TLR-3 e

promover o aumento da produção de IL-8, MIP-3 $\alpha$ , ICAM-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  e RANTES, assim como diminuir a secreção de IL-1RA, a qual tem um papel protetor e anti-inflamatório.

Considerando a imunidade celular, os neutrófilos são as células inflamatórias predominantemente encontradas na secreção vaginal de pacientes com tricomonose. Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) têm papel chave na imunomodulação e no processo microbicida desempenhado pelos neutrófilos. Neste sentido, os trofozoítos de *T. vaginalis* já demonstraram ser capazes de estimular a secreção de ânions superóxido e da enzima mieloperoxidase por estas células imunes (SONG e RYU, 2013), além de estimular a liberação de elevados níveis de óxido nítrico através da via da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (FRASSON *et al.*, 2012b). RYU *et al.* (2004) também mostraram que neutrófilos estimulados com trofozoítos vivos induzem a produção de IL-8 através das vias de sinalização do fator nuclear NF- $\kappa$ B e da proteína MAP cinase (RYU *et al.*, 2004). Além disso, tem sido demonstrado que *T. vaginalis*, assim como seus produtos secretados, são capazes de produzir leucotrieno B4 (SHAIO *et al.*, 1992), o qual ativa a produção de IL-8 em neutrófilos e mastócitos (NAM *et al.*, 2011; 2012).

Por outro lado, os parasitos induzem a apoptose de neutrófilos através da ativação da caspase-3 e redução da expressão de Mcl-1, uma proteína antiapoptótica (KANG *et al.*, 2006). 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 ainda diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IL-6, reduzindo a resposta inflamatória (AHN *et al.*, 2008).

Finalmente, cabe aqui ressaltar que apesar da imunidade inata desempenhar papel de destaque na defesa contra o parasito, a resposta imune adaptativa também exerce função na tentativa de eliminar o patógeno. A infecção por *T. vaginalis* resulta em anticorpos parasito-específicos no trato reprodutivo (SCHWEBKE e BURGESS,

2004), sendo detectados níveis de IgA e IgG nas secreções vaginais de mulheres com tricomonose aguda (YADAV *et al.*, 2005). Na maioria dos casos a presença de anticorpos também é encontrada no soro do paciente, especialmente IgGs contra diversos tipos de cisteína proteases, IgM e IgA (YADAV *et al.*, 2005; ACKERS, 1990). No entanto, apesar da produção e/ou secreção de anticorpos, esses promovem uma proteção limitada ao paciente, decaindo progressivamente após a erradicação da doença. De seis a doze meses após a infecção, nem anticorpos específicos contra *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. 4. Sinalização Purinérgica

As páginas 36-44 da versão completa desta tese foram suprimidas uma vez que correspondem ao seguinte capítulo de livro:

FRASSON, Amanda Piccoli; VIEIRA, Patrícia de Brum; TASCA, Tiana. **Involvement of Extracellular ATP and Derivates in *Trichomonas vaginalis* Infection.** In: KUESTER, Ebert; TRAUGOTT, Gisa. Adenosine Triphosphate Chemical Properties, Biosynthesis and Function in Cells. NewYork: Nova Science Publishers, 2013. P. 187-195.

## RESUMO DO CAPÍTULO:

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. O ATP assim como outros nucleotídeos são liberadas pelas células em resposta à injúria tecidual ou a patógenos exógenos. 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. 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. Ambos, ATP e adenosina, desenvolvem seus efeitos através da ativação de receptores específicos de membrana chamados P2 e P1, respectivamente. A regulação dessa via sinalizadora é atribuída a enzimas chamadas ectonucleotidases, as quais compreendem as seguintes famílias: ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDases), fosfodiesterase, fosfatase alcalina e ecto-5'-nucleotidase. Essas enzimas são localizadas na superfície celular ou ainda podem ser secretadas e encontradas nos fluídos corporais e no meio intersticial. Sequencialmente à atividade da ecto-5'-nucleotidase, a enzima adenosina deaminase (ADA) catalisa a deaminação irreversível da adenosina e 2'-deoxiadenosina à inosina e 2'-deoxi-inosina, respectivamente.

Assim, o sistema purinérgico constitui uma importante rede de sinalização celular que emprega purinas (especialmente ATP e adenosina) como moléculas sinalizadoras, as quais podem ser degradadas pela ação das ectonucleotidases, transportadas por carreadores específicos ou ainda, podem se ligar aos purinoceptores. Em parasitos, a sinalização purinérgica representa um importante mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro uma vez que está envolvida com a degradação do ATP proinflamatório e com a produção de adenosina anti-inflamatória. A adenosina, além de desempenhar um papel importante na limitação da resposta

inflamatória, também é fundamental para a manutenção do crescimento e sobrevivência do parasito considerando que muitos são incapazes de sintetizar *de novo* as purinas.

*Trichomonas vaginalis* é um protozoário flagelado parasita do trato urogenital humano, agente etiológico da tricomonose, a doença sexualmente transmissível não-viral mais comum no mundo. A investigação de aspectos bioquímicos do parasito e sua relação com o hospedeiro podem ajudar a identificar alguns mecanismos da patogênese da doença. As enzimas NTPDase, ecto-5'-nucleotidase e ADA já foram bioquimicamente caracterizadas nos trofozoítos de *T. vaginalis*. Nosso grupo de pesquisa tem mostrado a importância dessas enzimas para o parasito, uma vez que em um ambiente com baixa concentração de adenosina as enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase atuam na tentativa de fornecer o nucleosídeo necessário para o crescimento dos parasitos. Além disso, os nucleotídeos da adenina (ATP, ADP, ATP $\gamma$ S) não foram capazes de modular a produção de óxido nítrico (NO) pelos neutrófilos após estímulo com *T. vaginalis*; diferentemente a adenosina e a inosina promoveram significativa redução da secreção de NO, provavelmente através da ativação de receptores A<sub>2A</sub>, evidenciando sua característica anti-inflamatórias.

Considerando que a concentração de nucleotídeos púricos livres no ambiente vaginal pode ser extremamente elevada, a hidrólise destes pelas ectonucleotidases de *T. vaginalis* é uma estratégia importante para proteção dos parasitos dos efeitos citotóxicos do ATP e para a produção de adenosina, cujos efeitos supressores e imunomoduladores também contribuem para o estabelecimento da infecção, além de ser fundamental à sobrevivência do parasito que não realiza síntese *de novo* de purinas. Finalmente, as enzimas podem ser consideradas possíveis marcadores patogênicos na identificação de isolados de *T. vaginalis*, assim como possíveis adjuvantes no diagnóstico da tricomonose e ainda, interessantes alvos para o tratamento da infecção.



---

---

## I.5. Objetivos





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

- Caracterizar a expressão gênica de cinco NTPDases putativas de *T. vaginalis*;
- Investigar a participação da sinalização purinérgica na relação parasito-hospedeiro.

Os objetivos específicos propostos foram:

1. Analisar a expressão gênica de cinco NTPDases putativas em diferentes isolados de *T. vaginalis* e avaliar o perfil destas sob uma condição estimulatória da atividade da enzima NTPDase;
2. Investigar o envolvimento da sinalização purinérgica na produção de mediadores inflamatórios produzidos por células epiteliais vaginais e cervicais estimuladas com trofozoítos de *T. vaginalis* e avaliar a citotoxicidade do parasito frente a essas células;
3. Investigar o envolvimento da sinalização purinérgica na produção de mediadores inflamatórios produzidos por neutrófilos estimulados com trofozoítos de *T. vaginalis*.



## **PARTE II**





## II. Artigos Científicos



**CAPÍTULO II. 1:** Amanda Piccoli Frasson, Odelta dos Santos, Lúcia Collares Meirelles, Alexandre José Macedo, Tiana Tasca. **Five Putative Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases (NTPDases) genes are expressed in *Trichomonas vaginalis*.**

As páginas 53-81 da versão completa desta tese foram suprimidas uma vez que correspondem ao manuscrito a ser submetido ao periódico *Parasitology Research*.

**RESUMO DOS RESULTADOS:**

Nossos resultados mostraram que diferentes isolados de *T. vaginalis* expressam os genes *TvNTPDase1*, 2, 3, 4 e 5, sendo observado o maior número de transcritos para *TvNTPDase1*, 2 e 4. A sequência preditiva de aminoácidos revelou a presença das cinco regiões conservadas da apirase, domínios transmembrana, sítios de fosforilação, peptídeos sinais e os prováveis sítios ativos da enzima. A análise filogenética demonstrou maior similaridade das *TvNTPDases* com as formas intracelulares da enzima, como as *NTPDases* 4 e 7 humanas e a de *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, a restrição de soro promoveu aumento significativo da atividade da *NTPDase* de *T. vaginalis*, no entanto sem corresponder com o aumento de expressão gênica de determinada(s) sequência(s).

**CAPÍTULO II. 2:** Amanda Piccoli Frasson, Lúcia Collares Meirelles, Gustavo Krumel Goelzer, Solange Cristina Garcia, Tiana Tasca. **Participation of Purinergic Signaling on *Trichomonas vaginalis*-Host Relationship.**

As páginas 82-110 da versão completa desta tese foram suprimidas uma vez que correspondem ao manuscrito a ser submetido ao periódico *Microbes and Infection*.

**RESUMO DOS RESULTADOS:**

Quanto à participação da sinalização purinérgica na resposta inflamatória de células do hospedeiro frente ao parasito, foram utilizados como modelos celulares as células epiteliais vaginais (HMVII) e cervicais (HeLa). As linhagens HMVII e HeLa mostraram expressar todos os subtipos de receptores P1, P2X e P2Y e os diferentes isolados de *T. vaginalis*, que foram cocultivados com as células, mostraram hidrolisar eficientemente os nucleotídeos ATP, ADP e AMP. Ainda, o isolado clínico fresco TV-LACM6 foi o único a apresentar elevada citotoxicidade frente às células epiteliais vaginais e cervicais, no entanto não foi detectado aumento da liberação de ATP pelas células após o cocultivo, provavelmente devido à alta atividade da enzima NTPDase observada nesse isolado. Os trofozoítos de *T. vaginalis* não foram capazes de aumentar a produção de IL-8 e IL-6 pelas linhagens HMVII e HeLa, e apenas os isolados ATCC30236 e TV-LACM6 causaram aumento na secreção da citocina MIP-3 $\alpha$  pelas células epiteliais cervicais. Finalmente, o nucleotídeo ATP e o nucleosídeo adenosina não modularam a produção dos mediadores inflamatórios aqui investigados.



**CAPÍTULO II. 3:** Amanda Piccoli Frasson, Camila Braz Menezes, Gustavo Krumel Goelzer, Solange Cristina Garcia, Alexandre José Macedo, Tiana Tasca. **Increased bioavailability of adenosine due to adenosine deaminase inhibition leads to reduction of reactive oxygen species (ROS) and interleukin-8 (IL-8) production by neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*.**

As páginas 111-139 da versão completa desta tese foram suprimidas uma vez que correspondem ao manuscrito a ser submetido ao periódico *Purinergic Signalling*.

#### RESUMO DOS RESULTADOS:

Neste capítulo avaliou-se a participação da sinalização purinérgica na relação *T. vaginalis* e neutrófilos, uma vez que essas células imunes são as predominantemente encontradas no sítio da tricomonose. Os neutrófilos mostraram aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e IL-8 após incubação com os trofozoítos de *T. vaginalis*. Os nucleotídeos e nucleosídeos da adenina e guanina não produziram efeito na produção de ERO e IL-8; no entanto, quando o nucleosídeo adenosina foi incubado junto com o inibidor da enzima ADA (EHNA) observou-se uma redução significativa da produção de ERO e IL-8 pelos neutrófilos, devido à inibição da ADA e consequentemente, ao aumento da concentração de adenosina disponível no meio extracelular. O envolvimento do receptor A1 de neutrófilos neste processo foi evidenciado.



## **PARTE III**



---

---

## III.1. Discussão Geral



A infecção por *T. vaginalis* trata-se da DST de origem não viral com maior frequência mundial, sendo crescentes os números acerca da doença – segundo os últimos dados da OMS, 276 milhões de novos casos são registrados anualmente (WHO, 2012). Apesar de a infecção ser em geral de fácil cura, graves complicações podem estar associadas à tricomonose, incluindo doença inflamatória pélvica, aumento do risco de infertilidade, predisposição ao câncer cervical e ao câncer de próstata, 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 tratamento da infecção é baseado no uso dos fármacos pertencentes ao grupo dos 5-nitroimidazóis, sendo o metronidazol, introduzido no mercado há 55 anos e até hoje, a escolha terapêutica para o tratamento da tricomonose. Entretanto, os casos de resistência ao metronidazol chegam até 9,6% das infecções, o que representa um número significativo considerando a alta incidência da tricomonose (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). Nestes casos, a ausência de alternativas terapêuticas faz com que elevadas doses de metronidazol ou tinidazol (aprovados pelo FDA, *Food and Drug Administration, USA*) tenham que ser administradas, colaborando para o aparecimento de efeitos adversos e muitas vezes não sendo eficazes na erradicação da infecção. Diante deste contexto, torna-se evidente a necessidade da 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 à descoberta de novos agentes antiparasitários.

Considerando esta última proposta, a caracterização de proteínas ou macromoléculas-alvo 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 subsídios para uma busca racional de novas moléculas com atividade antiparasitária (DATTA *et al.*, 2008).

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 estejam presentes nas células não infectadas, e (ii) inibição seletiva de enzimas vitais do parasito, as quais são necessárias para sua reprodução (DATTA *et al.*, 2008). Diante do exposto, a caracterização de enzimas de *T. vaginalis* representa um avanço no entendimento da biologia do parasito e permite a prospecção de alvos que atuem especificamente sobre o micro-organismo.

Neste contexto, o estudo da sinalização purinérgica em parasitos patogênicos vem despertando interesse, uma vez que contribui para a compreensão de seus aspectos bioquímicos, assim como de sua relação com o hospedeiro. O sistema purinérgico é uma rede de sinalização extracelular onde estão envolvidos nucleotídeos e nucleosídeos púricos, receptores de membrana específicos - os purinoceptores, e ectonucleotidasas - enzimas que hidrolizam os nucleotídeos e nucleosídeos controlando dinamicamente os níveis de purinas (BURNSTOCK e VERKHRATSKY, 2009). Em parasitos, as ectonucleotidasas parecem desempenhar papel importante sobre o metabolismo e respostas imunes (SANSOM *et al.*, 2008). O seu envolvimento no metabolismo é facilmente entendido uma vez que essas enzimas são capazes de produzir adenosina a partir do ATP, e considerando que muitos parasitos não são capazes de sintetizar *de novo* purinas, o nucleosídeo formado é recaptado e incorporado no seu metabolismo (HEYWORTH *et al.*, 1982). A função das ectonucleotidasas na resposta imune está relacionada à capacidade destas enzimas em degradar ATP, que apresenta potenciais propriedades inflamatórias, e gerar adenosina, a qual é capaz de reverter inúmeros dos efeitos promovidos pelo ATP devido sua característica imunossupressora (DEAGLIO *et al.*, 2007).



Em *T. vaginalis*, as ectonucleotidases NTPDase e ecto-5'-nucleotidase e a enzima adenosina deaminase (ADA) já foram bioquimicamente caracterizadas (MATOS *et al.*, 2001; TASCA *et al.*, 2003; WEIZENMANN *et al.*, 2011) por nosso grupo de pesquisa e hoje, os esforços estão centrados na busca pelo entendimento da função destas enzimas no desenvolvimento da infecção. A enzima NTPDase é responsável pela hidrólise de nucleosídeos tri e difosfatados e além de sua caracterização bioquímica já ter sido realizada em trofozoítos de *T. vaginalis* (MATOS *et al.*, 2001), a expressão gênica de duas sequências da enzima já foi avaliada em diferentes isolados. Mais recentemente, uma importante revisão revelou a presença de cinco NTPDases preditivas no genoma do parasito e destacou a necessidade de estudos que avaliassem a expressão gênica dos cinco membros e a possível identificação da(s) sequência(s) associada(s) à atividade enzimática (SANSOM, 2012). Ainda, investigações moleculares acerca de proteínas hipotéticas do genoma de *T.vaginalis* podem trazer valiosas contribuições para a caracterização dessas proteínas que incrivelmente, ainda compreendem 86% do genoma do parasito (CONRAD *et al.*, 2013).

No sentido de colaborar com o acima exposto, o capítulo II. 1 desta tese teve o objetivo de avaliar a expressão gênica das cinco NTPDases putativas encontradas no genoma de *T. vaginalis*. As cinco sequências foram expressas em nível de RNAm nos três diferentes isolados investigados (ATCC e isolados clínicos frescos) demonstrando que a expressão da enzima é preservada mesmo após longos períodos de cultivo em laboratório. Além disso, os dados quantitativos evidenciaram que as diferentes sequências produzem números similares de transcritos independente do isolado. Enquanto os genes *TvNTPDase1*, 2 and 4 foram os mais expressos nos três isolados, os genes *TvNTPDase3* and 5 foram aqueles que apresentaram menor expressão. De acordo com Carlton *et al.* (2007), a presença de famílias multigenes, onde todos os membros são expressos, parece ser uma estratégia desenvolvida pelo parasito para uma melhor adaptação ao ambiente hostil em que se encontra.

A fim de identificar a(s) sequência(s) gênica(s) preferencialmente associada(s) com a atividade da NTPDase, os trofozoítos foram submetidos a uma condição sabidamente estimulatória da atividade da enzima - a limitação de soro. Esta situação promove um estado de privação de adenosina, uma vez que o soro é capaz de prover ao parasito uma concentração de 0,3-0,6  $\mu\text{M}$  do nucleosídeo (RAPAPPORT e ZAMECNIK, 1978; HASKÓ e CRONSTEIN, 2004). Em um estudo prévio nós demonstramos que sob tal condição as enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis* aumentam significativamente sua atividade, sugerindo que as ectonucleotidases estejam atuando na tentativa de gerar a adenosina necessária ao crescimento dos trofozoítos (FRASSON *et al.*, 2012a). No presente estudo, novamente a atividade enzimática da NTPDase foi aumentada em resposta a menor oferta de adenosina, no entanto, quanto à expressão gênica, uma profunda heterogeneidade pôde ser observada nos trofozoítos cultivados sob limitação de soro, não tornando possível a identificação clara da(s) sequência(s) relacionada(s) à atividade enzimática. Este resultado demonstra a complexidade das famílias multigenes assim como, dos sistemas regulatórios de transcrição gênica em *T. vaginalis* (SMITH and JOHNSON, 2011).

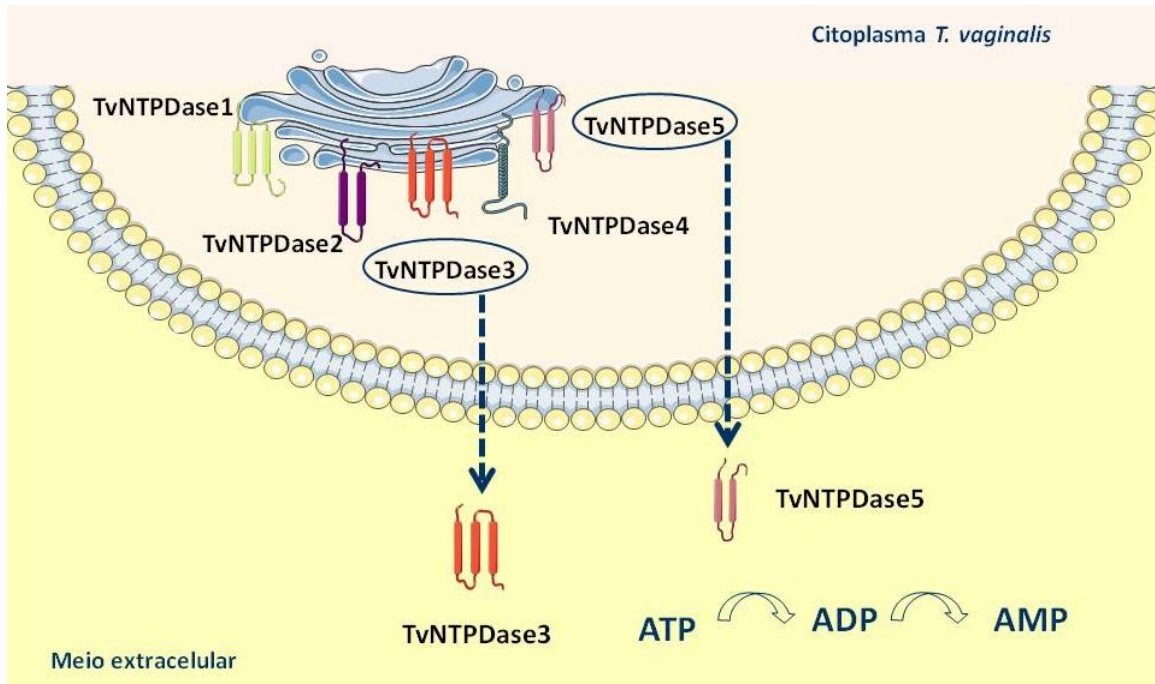
As análises preditivas das sequências de aminoácidos indicam que as enzimas apresentam domínios transmembrana, diversos sítios de fosforilação e ainda, as cinco ACRs, regiões fundamentais para a caracterização da NTPDase. Além disso, as TvNTPDase3 e 5 também mostram regiões que codificam peptídeo sinal. Aliando esses achados às informações obtidas através da análise filogenética, onde as cinco TvNTPDases demonstraram compartilhar o mesmo clado que NTPDases tipicamente intracelulares como as NTPDases humanas 4 e 7 e a enzima de *S. cerevisiae*, pode-se supor que as NTPDases de *T. vaginalis* estejam ancoradas a membranas de organelas citoplasmáticas e que as TvNTPDases3 e 5 possam apresentar uma forma solúvel. Ainda, sabendo que *T. vaginalis* conta com um grande arsenal de proteínas cinases (CARLTON *et al.*, 2007), os prováveis sítios de fosforilação podem estar envolvidos em importantes alterações pós-traducionais. E finalmente, de forma relevante, a maioria dos sítios catalíticos preditos nas TvNTPDases1, 2, 4 e 5 compartilham os

mesmos aminoácidos que as ACRs, o que reforça a ideia de que estas regiões conservadas estejam associadas à atividade enzimática (KOZAKIEWICZ *et al.*, 2008).

As formas intracelulares da NTPDase apresentam funções distintas daquelas localizadas na membrana celular e são profundamente menos estudadas (KNOWLES, 2011). Assim como demonstrado para *S. cerevisiae* e *L. major*, as enzimas que se encontram ancoradas à superfície de organelas intracelulares, como o complexo de Golgi, podem desempenhar uma função relacionada às reações de glicosilação. As NTPDases estariam hidrolizando os nucleotídeos resultantes de etapas anteriores da reação de glicosilação que atuam inibindo a ação das glicosiltransferases (SANSOM *et al.*, 2014; ZIMMERMANN, 2001). Além desta possível função, as NTPDases intracelulares também podem estar envolvidas em outros processos celulares, por exemplo nutrição, como proposto para a NTPDase1 de *T. cruzi* (MARIOTINI-MOURA *et al.*, 2014).

Diante do exposto, podemos traçar a hipótese de que as TvNTPDase1, 2 e 4, aquelas que apresentaram a maior expressão gênica, estariam ancoradas à membrana de organelas intracelulares desempenhando uma função até então não conhecida; enquanto as formas TvNTPDase3 e 5, com menor número de transcritos, seriam secretadas ao meio extracelular onde estariam hidrolizando os nucleotídeos e exercendo o conhecido papel das NTPDases (Figura 4). Outra hipótese a ser discutida é a de que as TvNTPDases possam atuar como proteínas multifuncionais ou *moonlighting*, assim como observado para as adesinas (COLLINGRIDGE *et al.*, 2010). As adesinas (AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23) são proteínas que apresentam diferentes funções dependendo de sua localização; quando presentes nos hidrogenossomos elas atuam como enzimas metabólicas, no entanto, quando migram para a superfície do parasito exercem a função de adesina, auxiliando na citoaderência (ARROYO *et al.*, 1992; MORENO-BRITO *et al.*, 2005). Processo semelhante pode ocorrer com as TvNTPDases, as quais poderiam apresentar localização intracelular e serem redirecionadas à membrana plasmática onde realizariam a hidrólise dos nucleotídeos extracelulares, uma vez que Tasca *et al.* (2004) demonstraram por análise

citoquímica a atividade da NTPDase de *T. vaginalis* na superfície externa do parasito. Evidentemente este cenário é apenas presuntivo e a exata localização e expressão das proteínas necessitam ser confirmadas assim que houver disponibilidade das enzimas clonadas e purificadas.



**Figura 4.** Representação esquemática de uma hipótese da localização das TvNTPDases. As TvNTPDase1, 2 e 4 podem estar ancoradas à membrana de organelas intracelulares enquanto as TvNTPDases 3 e 5 podem ser secretadas ao meio extracelular.

Como mencionado anteriormente, em parasitos, o sistema purinérgico está intimamente relacionado a aspectos bioquímicos e de metabolismo, assim como vem sendo investigado quanto ao seu envolvimento na relação parasito-hospedeiro. A sinalização purinérgica medeia importantes processos inflamatórios e imunes, e em virtude disso, pode ter papel importante na patogênese assim como na evasão do sistema imune.

O primeiro passo para o estabelecimento da infecção por *T. vaginalis* é a degradação do muco seguida pela adesão às células epiteliais vaginais, cervicais ou uretrais. A citoaderência tem sido considerada causa primária da reação inflamatória

no sítio da infecção e é seguida por uma cascata de eventos que levam à citotoxicidade, sendo eles: citólise, fagocitose e desintegração das monocamadas do epitélio vaginal, cervical ou uretral (FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012; PETRIN *et al.*, 1998). Alguns dias após a infecção, a degeneração do epitélio elícita uma intensa infiltração leucocitária, essencialmente composta por neutrófilos, os quais são os responsáveis por promover a principal resposta inflamatória na tricomonose, mantendo os tecidos do trato urogenital intensamente inflamados e contribuindo para o aparecimento do característico e abundante corrimento observado em pacientes infectadas com o parasito (FICHOROVA *et al.*, 2006).

Baseado neste panorama da infecção surgiu a curiosidade de investigar a participação da sinalização purinérgica na relação parasito-hospedeiro. A abordagem escolhida foi avaliar o envolvimento dos componentes do sistema purinérgico, sejam eles nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, ectonucleotidases ou purinoceptores, sobre as respostas inflamatórias desencadeadas por *T. vaginalis* nas células humanas. O capítulo II. 2 investiga essa relação nas células-alvo para o parasito - as células epiteliais vaginais e cervicais (Figura 5), enquanto o capítulo II. 3 concentra-se nas principais células imunes envolvidas na tricomonose - os neutrófilos.

Considerando o capítulo II. 2 desta tese, as células epiteliais vaginais e cervicais foram utilizadas como modelo para o estudo da relação parasito-hospedeiro. Ambas as células são responsáveis pela manutenção da infecção por *T. vaginalis*, uma vez que elas provêm o sítio para aderência, sobrevivência e multiplicação do protozoário. Ainda, considerando a ausência de um modelo *in vivo* adequado para o estudo da tricomonose, as linhagens celulares representam o mais fidedigno sistema para estudo da relação *T. vaginalis*-hospedeiro (FICHOROVA, 2009).

A expressão dos genes codificadores dos purinoceptores foi avaliada em ambas as linhagens (HMVII e HeLa), as quais demonstraram expressar todos os subtipos de receptores P1 e P2. Esse achado vem colaborar com a ubiquidade da sinalização purinérgica nos diversos sistemas fisiológicos do organismo e sugere um possível

papel desta no trato urogenital feminino. Dessa maneira, no sítio da infecção, onde a concentração de nucleotídeos pode atingir até 10 mM como resultado do dano celular (MUNAGALA e WANG, 2003), estes podem desenvolver seus efeitos através da ativação dos receptores P2X ou P2Y, e ainda, após hidrólise pelas ectonucleotidases, o nucleosídeo adenosina torna-se disponível para ativar os receptores P1.

A capacidade de hidrólise de nucleotídeos extracelulares foi avaliada nos diferentes isolados de *T. vaginalis*, nos quais ficou evidente as atividades das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase. Os isolados de pacientes do sexo feminino (TV-LACM6, TV-LACM11, TV-LACM15 e TV-LACM22) foram aqueles que mostraram maior hidrólise de ATP e ADP quando comparados com o isolado mantido por longo período em laboratório (ATCC30236) ou com o isolado proveniente de paciente do sexo masculino (TV-LACH4). O mesmo perfil não foi observado para a enzima ecto-5'-nucleotidase, a qual apresentou taxas de hidrólise bem inferiores do que a NTPDase. O conjunto de dados acerca da atividade da NTPDase sugere uma possível associação da enzima com a virulência do parasito, uma vez que as atividades mais altas foram encontradas em isolados de *T. vaginalis* provenientes de mulheres, as quais mais frequentemente desenvolvem os sintomas da doença. Relação semelhante já foi demonstrada em tripomastigotas de *T. cruzi* onde uma baixa atividade da NTPDase estava associada com diminuição da infectividade às células mamíferas (SANTOS *et al.*, 2009) e também em *L. amazonensis*, onde foi observado uma maior atividade da enzima em cepas virulentas quando comparado com cepas não virulentas, e ainda, um aumento de mais de dez vezes na atividade da enzima quando o parasito encontra-se na forma intracelular obrigatória amastigota (PINHEIRO *et al.*, 2006).

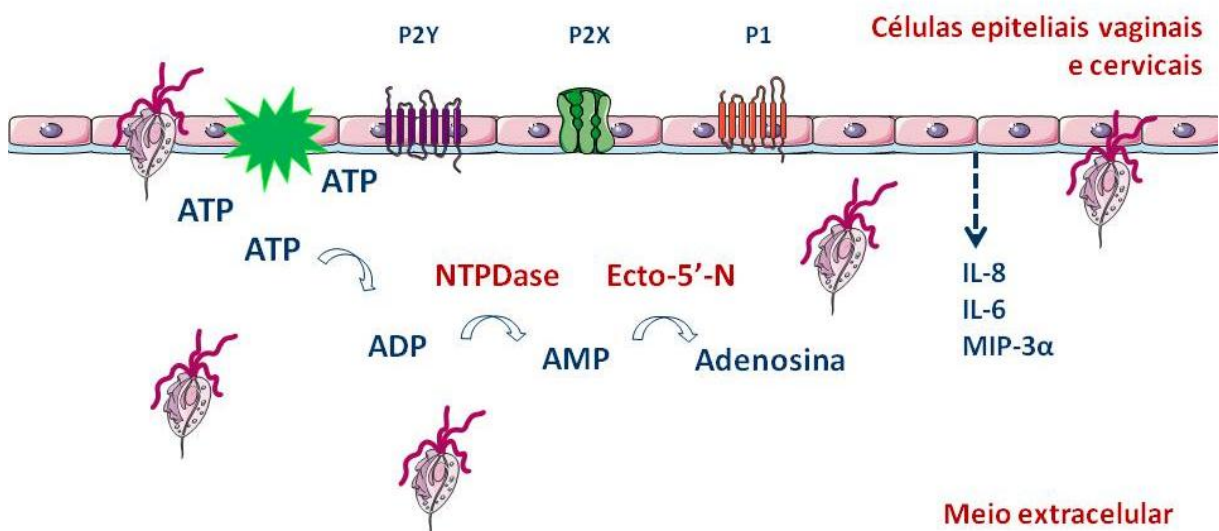
Uma ação ativa da enzima NTPDase ficou evidente ao avaliar-se a liberação de ATP para o sobrenadante das células epiteliais vaginais e cervicais após estas terem sofrido um extenso dano provocado pelo isolado TV-LACM6. O ATP é universalmente conhecido como sendo uma molécula capaz de ser liberada para o meio extracelular após estresse, metabolismo ativo ou injúria tecidual. Esta secreção pode ocorrer devido à ruptura das células ou ainda através de canais de membrana,

transportadores ou exocitose (BURNSTOCK e VERKHRATSKY, 2009). No presente estudo, as células das linhagens HMVII e HeLa demonstraram secretar ATP para o meio extracelular após contato com o isolado menos agressivo, ATCC30236. Entretanto, na presença do isolado TV-LACM6 o aumento da concentração de ATP no sobrenadante das células não pôde ser detectado, o que pode ser entendido pelo fato deste isolado ter apresentado a maior atividade da enzima NTPDase e assim, conseguir hidrolizar eficientemente o ATP liberado.

Quando os trofozoítos de *T. vaginalis* foram cocultivados com as células epiteliais vaginais e cervicais não foi observado um aumento evidente na produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células humanas, diferentemente do que já havia sido descrito em alguns estudos anteriores (FICHOROVA *et al.*, 2012, 2013; TWU *et al.*, 2013). Essa discrepância pode ser devido a diferentes condições experimentais empregadas, como as linhagens celulares. No entanto os resultados aqui obtidos também devem ser valorizados uma vez que diferentes isolados, portando diferentes características, foram avaliados e sabe-se que o comportamento de *T. vaginalis* no tecido hospedeiro é isolado-dependente (KUSDIAN e GOULD, 2015). Isolados infectados ou não por *M. hominis* e por TVVs foram estudados e a presença destes micro-organismos intracelulares não foi encontrada estar relacionada a uma maior resposta inflamatória. A precisa contribuição de *M. hominis* ou TVVs para a virulência do parasito ainda é desconhecida e diversos estudos investigam um possível papel destes na sintomatologia, resistência aos fármacos, carga parasitária e transmissão do parasito (XIAO *et al.*, 2006; BUTLER *et al.*, 2010; GOODMAN *et al.*, 2011). A não ativação de importantes citocinas pró-inflamatórias das células vaginais e cervicais pelos isolados de *T. vaginalis* pode justamente significar uma modulação da resposta imune pelos parasitos, resultando em infecções mais severas. Interessantemente, o único mediador que teve seus níveis aumentados pela presença do parasito foi a proteína inflamatória de macrófagos, MIP-3 $\alpha$ . A citocina MIP-3 $\alpha$  ou CCL20 é predominantemente expressa em tecidos de mucosa (LEE *et al.*, 2015) e diferentemente das demais citocinas, que podem se ligar a diversos receptores

demonstrando uma falta de seletividade, MIP-3 $\alpha$  liga-se exclusivamente ao seu receptor CCR-6, através do qual promove suas respostas biológicas, sendo a principal delas a quimiotaxia de células imunes (SCHUTYSER *et al.*, 2003).

O nucleotídeo ATP, o nucleosídeo adenosina ou mesmo uma maior disponibilidade de adenosina devido à inibição da enzima adenosina deaminase pelo EHNA, não foram capazes de modular os níveis das citocinas inflamatórias aqui investigadas. Esses dados sugerem que apesar de haver expressão dos receptores P1 e P2 nas células epiteliais vaginais e cervicais, estes podem não ter sido ativados pela adenosina e ATP extracelulares, não sendo capazes de mediar a resposta inflamatória. Dessa forma, pode-se inferir que (i) a sinalização purinérgica parece não ter envolvimento sobre os principais mediadores inflamatórios produzidos pelas células epiteliais no sítio da infecção por *T. vaginalis*, ou que (ii) o modelo celular utilizado não foi capaz de prover as condições ideais para a atuação da sinalização purinérgica, ou ainda que (iii) a sinalização purinérgica pode estar envolvida na modulação de outros componentes da inflamação diferentes de IL-8, IL-6 e MIP-3 $\alpha$ .



**Figura 5.** Representação esquemática da participação da sinalização purinérgica na relação *T. vaginalis*-células epiteliais vaginais e cervicais. Ambas as linhagens celulares (epitelial vaginal e cervical) expressam todos os subtipos de purinoceptores, enquanto os diversos isolados de *T. vaginalis* exibem atividade de NTPDase e ecto-5'-nucleotidase. Ainda, os



isolados apresentam diferenças marcantes em relação à citotoxicidade às células do hospedeiro. A presença de trofozoítos de *T. vaginalis*, assim como de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares não é capaz de modular a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células epiteliais.

O capítulo II. 3 desta tese evidencia mais uma vez o papel-chave dos neutrófilos na tricomonose. Eles são as células imunes mais abundantes no sítio da infecção e os maiores responsáveis pelas respostas inflamatórias (ESCARIO *et al.*, 2010). Em contraste com o capítulo anterior (II. 2) onde a presença dos isolados de *T. vaginalis* não influenciaram a secreção de IL-8 e IL-6 pelas células epiteliais vaginais e cervicais, os achados deste capítulo deixam claro a ativação da produção de mediadores inflamatórios quando os neutrófilos são estimulados pelo parasito. Os níveis de ERO e IL-8 foram extensivamente aumentados na presença dos trofozoítos. A produção de ERO ocorre pela ação da enzima mieloperoxidase presente nos grânulos dos neutrófilos, e estas moléculas reativas atuam na defesa dos leucócitos buscando a eliminação dos trofozoítos (SONG e RYU, 2013). A formação de IL-8 parece ser dependente dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e CREB e da via de sinalização da MAP cinase (RYU *et al.*, 2004; NAM *et al.*, 2011) e em última análise, a secreção desta citocina no sítio da infecção por *T. vaginalis* pode promover maior infiltração e recrutamento de neutrófilos, os quais, quando acumulados, podem ser causa de uma inflamação persistente e grave (RYU *et al.*, 2004).

O envolvimento da sinalização purinérgica na resposta imune na tricomonose foi avaliado através dos efeitos causados por nucleotídeos e nucleosídeos da adenina e da guanina sobre a produção dos mediadores inflamatórios. Como já mencionado, os nucleotídeos e nucleosídeos atuam a nível extracelular como importantes moléculas sinalizadoras de processos imunes (BOURS *et al.*, 2006). Entretanto, essas conclusões são bem claras e estabelecidas para os compostos da adenina; para os nucleotídeos e nucleosídeo da guanina essas informações foram muito pouco exploradas até hoje.

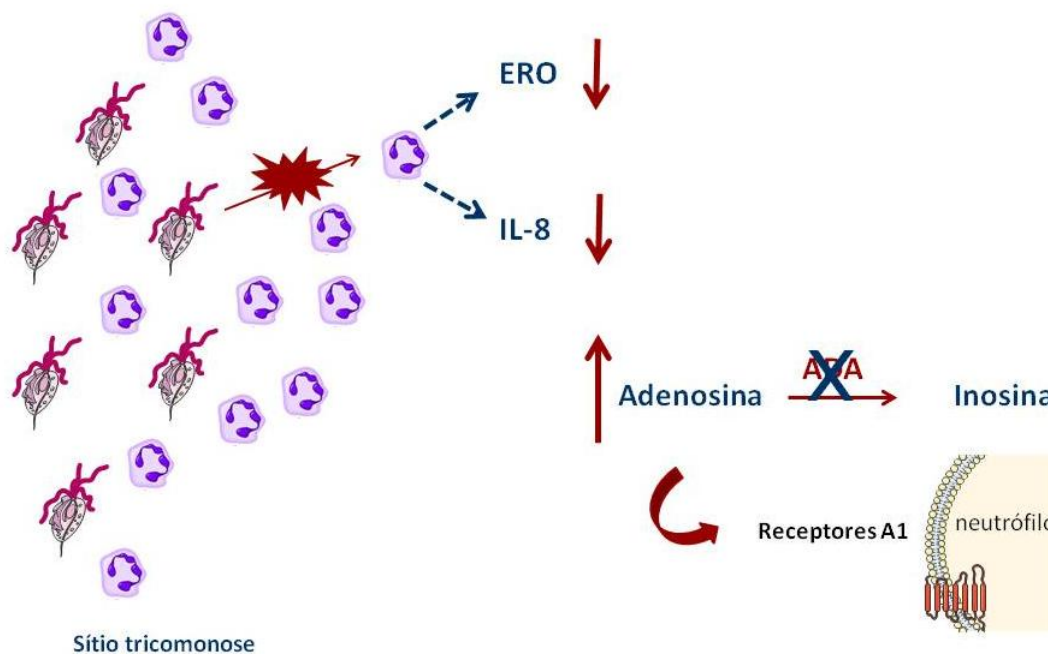
A nível de sistema nervoso central sabe-se que as purinas derivadas da guanina são secretadas para o meio extracelular por astrócitos e sinaptossomos e lá podem ser

hidrolizadas pela ação das ectonucleotidases; finalmente, essas purinas atuam na modulação da atividade glutamatérgica e em efeitos de comportamento, sendo consideradas como agentes neuroprotetores (SCHMIDT *et al.*, 2007). Em *T. vaginalis*, Harris *et al.* (1988) caracterizaram um transportador capaz de carrear guanina e guanosina e ainda, as ectonucleotidases NTPDase e ecto-5'-nucleotidase do parasito são capazes de hidrolizar GTP, GDP e GMP (MATOS *et al.*, 2001; TASCA *et al.*, 2003). Com base nessas informações decidiu-se avaliar um possível papel imunomodulador dessas moléculas na relação *T. vaginalis*-neutrófilos.

Os nucleotídeos extracelulares, sejam eles da adenina ou da guanina, não foram capazes de modular a produção de ERO, IL-8 e IL-6. Esses achados corroboram com os resultados de um trabalho anterior do nosso grupo, onde ficou demonstrado que os nucleotídeos ATP, ADP e AMP também não influenciam a secreção de óxido nítrico pelos neutrófilos cultivados com *T. vaginalis* (FRASSON *et al.*, 2012b). No presente estudo, os nucleosídeos adenosina e guanosina também não tiveram efeito sobre a produção dos mediadores citados. No entanto, a presença de adenosina somada ao inibidor da enzima ADA, o EHNA, foi capaz de reduzir significativamente os níveis de ERO e IL-8, evidenciando o papel imunossupressor do nucleosídeo. Esse efeito é provavelmente decorrente da maior disponibilidade de adenosina presente no sobrenadante do cocultivo de neutrófilos e trofozoítos, decorrente da inibição da enzima ADA, como demonstrado pelos nossos resultados. Embora o aumento de adenosina extracelular não tenha sido excessivo, sabe-se que ajustes finos na concentração do nucleosídeo no microambiente aliados ao perfil dos receptores dos neutrófilos (BARLETA *et al.*, 2012) resulta na ativação de determinado subtipo de receptor com seus consequentes efeitos.

A busca pela identificação do subtipo de receptor P1 envolvido com os efeitos imunossupressores da adenosina evidenciaram a ativação dos receptores A1, A2A e A3, com maior destaque ao receptor A1. Infelizmente, os resultados aqui obtidos não permitiram a elucidação completa da intervenção do sistema adenosinérgico na produção de ERO e IL-8 por neutrófilos estimulados com *T. vaginalis*. Dessa forma,

traça-se como perspectiva a realização do ensaio de Western-Blotting como uma ferramenta adicional para esclarecer a expressão dos receptores P1 após o cocultivo de neutrófilos e *T. vaginalis* com adenosina e EHNA.



**Figura 6.** Representação esquemática mostrando que os trofozoítos de *T. vaginalis* são capazes de estimular a produção de mediadores inflamatórios pelos neutrófilos e que o acúmulo de adenosina, devido inibição da enzima ADA, e consequente ativação dos receptores A1 dos neutrófilos leva à redução da produção de ERO e IL-8.

Finalmente, a tese aqui apresentada avaliou a relação da sinalização purinérgica com o parasito *T. vaginalis* essencialmente sob duas óticas: a da biologia molecular, através do estudo gênico de uma ectonucleotidase, e a da biologia celular, através da relação entre o parasito e as células de seu hospedeiro. Ambas abordagens contam com uma forte presença da bioquímica, ciência básica e fundamental no entendimento do sistema purinérgico. Dessa forma, o capítulo II. 1 caracterizou a expressão gênica da enzima NTPDase de *T. vaginalis*, contribuindo para um maior entendimento a nível molecular e uma compreensão mais ampla acerca da ectonucleotidase. Os capítulos II. 2 e II. 3 demonstraram a participação dos componentes do sistema purinérgico – purinas extracelulares, ectonucleotidasas e purinoceptores – na relação parasito-

hospedeiro, utilizando células epiteliais vaginais e cervicais ou neutrófilos como modelos celulares. O envolvimento dessa rede de sinalização foi aqui evidenciado, embora um perfil único ou uma característica definitiva não possam ser traçados em virtude da complexa e fina regulação dessa via sinalizadora. Os estudos aqui iniciados abrem inúmeras possibilidades para a investigação das diversas interações que existem no campo da sinalização purinérgica em *T. vaginalis*.

---

---

## III. 2. Conclusões Gerais



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

#### Do capítulo II. 1

- As cinco TvNTPDase putativas tiveram suas sequências gênicas expressas em diferentes isolados de *T. vaginalis*;
- A análise preditiva da sequência de aminoácidos mostrou a presença de domínios transmembrana, peptídeo sinal, inúmeros sítios de fosforilação e possíveis sítios ativos que compartilham a mesma sequência de aminoácidos que as cinco ACRs;
- A análise filogenética revelou que as TvNTPDases compartilham o mesmo clado que NTPDases tipicamente intracelulares;
- Os genes *TvNTPDase1*, *2* e *4* apresentaram as maiores expressões, enquanto os genes *TvNTPDase3* e *5* foram os que apresentaram menor expressão, embora sejam os mais estáveis;
- Em uma situação em que a atividade da NTPDase encontra-se aumentada (limitação de soro), as cinco sequências gênicas apresentaram um perfil heterogêneo de expressão, não evidenciando algum dos genes como o principal responsável pela atividade.

#### Do capítulo II. 2

- As células epiteliais vaginais e cervicais expressaram os genes para todos os subtipos de receptores P1, P2X e P2Y;
- Os isolados de *T. vaginalis* provenientes de pacientes do sexo feminino apresentaram as maiores atividades de NTPDase quando comparados com isolados mantidos por longo período em cultivo ou provenientes de pacientes do sexo masculino;

- Os diferentes isolados de *T. vaginalis* não modularam a produção das citocinas IL-8 e IL-6 pelas células epiteliais vaginais e cervicais, enquanto dois isolados (ATCC30236 e TV-LACM6) aumentaram a secreção de MIP-3 $\alpha$  pelas células epiteliais cervicais;
- O nucleotídeo ATP e o nucleosídeo adenosina não tiveram influência sobre a produção de IL-8, IL-6 e MIP-3 $\alpha$  pelas células epiteliais vaginais e cervicais;
- O isolado clínico TV-LACM6 apresentou intensa citotoxicidade frente às células do hospedeiro, quando comparado com o isolado ATCC30236;
- O isolado ATCC30236 promoveu aumento da liberação de ATP para o espaço extracelular, enquanto no isolado TV-LACM6 esse aumento não foi observado devido à ação da enzima NTPDase.

### Do capítulo II. 3

- *T. vaginalis* estimulou a produção de ERO e IL-8 por neutrófilos;
- *T. vaginalis* não promoveu a secreção de IL-6, bem como a degranulação de neutrófilos;
- Os nucleotídeos e nucleosídeos da adenina e da guanina não modularam os níveis de ERO, IL-8 ou IL-6 produzidos pelos neutrófilos estimulados com *T. vaginalis*;
- A presença de adenosina junto com o inibidor da ADA, EHNA, foi capaz de reduzir a produção de ERO e IL-8 pelos neutrófilos estimulados com *T. vaginalis*;
- O inibidor EHNA reduziu a atividade da ADA no cocultivo de neutrófilos e *T. vaginalis* e promoveu aumento na concentração de adenosina disponível no sobrenadante;
- Não foi possível identificar com precisão o subtipo de receptor P1 envolvido com o efeito imunossupressor observado na presença de adenosina e EHNA, no entanto o receptor A1 foi o que apresentou maior expressão na análise de imunofluorescência.



---

---

### III. 3. Perspectivas



Alguns aspectos intrigantes envolvidos na sinalização purinérgica de *T. vaginalis* merecem ser investigados futuramente:

- Avaliar o envolvimento da sinalização purinérgica na produção de citocinas próinflamatórias pelas células epiteliais vaginais e cervicais utilizando todos os isolados de *T. vaginalis* disponíveis em nossa coleção;
- Avaliar o envolvimento da sinalização purinérgica na produção de citocinas próinflamatórias por células epiteliais de próstata estimuladas com *T. vaginalis*;
- Identificar o subtipo de receptor P1 dos neutrófilos envolvido na redução da produção de ERO e IL-8 no cocultivo de neutrófilos e *T. vaginalis* através da técnica de Western-Blotting;
- Realizar o silenciamento gênico das enzimas NTPDases putativas de *T. vaginalis* com o uso de oligonucleotídeos antisense.



---

---

### III. 4. Referências



- ACKERS, J. P. Immunologic aspects of human trichomonosis. In: HONIGBERG, B. M. (Ed.). *Trichomonads Parasitic in Humans*. New York: Springer, 1990. p. 36-52.
- 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*, v. 30, p. 410-416, 2008.
- ARROYO, R.; ENGBRING, J.; ALDERETE, J.F. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology*, v. 6, p. 853e862, 1992.
- 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.
- BARLETTA, K. E.; LEY, K.; MEHRAD, B. Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 32, p. 856-64, 2012.
- BENCHIMOL, M. Trichomonads under Microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, v. 10, p. 528-550, 2004.
- 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.; VERKHRATSKY, A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiologica*, v. 195, p. 415-447, 2009.
- BUTLER, S. E.; AUGOSTINI, P.; SECOR, W. E. *Mycoplasma hominis* infection of *Trichos vaginalis* is not associated with metronidazole-resistant trichomoniasis in clinical isolates from the United States. *Parasitology Research*, v. 107, p. 1023-1027, 2010.
- CARLTON, J. M.; HIRT, R. P.; SILVA, J. C.; DELCHER, A. L.; SCHATZ, M.; ZHAO, Q., et al. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, v. 315, p. 207-212, 2007.
- CAVALIER-SMITH, T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, p. 297-354, 2002.
- 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.

COLLINGRIDGE, P.W.; BROWN, R.W.B.; GINGER, M.L. Moonlighting enzymes in parasitic protozoa. *Parasitology*, v. 137, p. 1467-1475, 2010.

CONRAD, M. D.; BRADIC, M.; WARRING, S. D.; GORMAN, A. W.; CARLTON, J. M. Getting trichy: tools and approaches to interrogating *Trichomonas vaginalis* in a post-genome world. *Cell Press*, v. 29, p. 17-25, 2013.

CORNELIUS, D. C.; ROBINSON, D. A.; MUZNY, C. A.; MENA, L. A.; AANENSEN, D. M.; LUSHBAUGH, W. B.; MEADE, J. C. Genetic characterization of *Trichomonas vaginalis* isolates by use of multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 10, p. 3293-3300, 2012.

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-LEWIS, K. A.; SECOR, W. E. *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.

DEAGLIO, S.; DWYER, K.M.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; USHEVA, A.; ERAT, A.; et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, v. 204, p. 1257-1265, 2007.



- ESCARIO, A.; GÓMEZ BARRIO, A.; SIMONS DIEZ, B.; ESCARIO, J. A. Immunohistochemical study of the vaginal inflammatory response in experimental trichomoniasis. *Acta Tropica*, v. 114, p. 22-30, 2010.
- 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.
- FICHOROVA, R. N.; LEE, Y.; YAMAMOTO, H.; TAKAGI, Y.; HAYES, G.; GOODMAN, R. P.; CHEPA-LOTREA, X.; BUCK, O. R.; MURRAY, R.; KULA, T.; BEACH, D. H.; SINGH, B. N.; NIBERT, M. L. Endobiont Viruses Sensed by the Human Host – Beyond Conventional Antiparasitic Therapy. *Plos One*, v. 7, p. 1-16, 2013.
- FIGUEROA-ANGULO, E. E.; RENDÓN-GANDARILLA, F. J.; PUENTE-RIVERA, J.; CALLA-CHOQUE, J. S.; CÁRDENAS-GUERRA, R. E.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; QUINTAS-GRANADOS, L. I.; ALVAREZ-SÁNCHEZ, M. E.; ARROYO, R. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection*, v. 15, p. 1411-1427, 2012.
- FRASSON, A. P.; CHARÃO, M. F.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; GARCIA, S. C.; BONORINO, C.; BOGO, M. R.; DE CARLI, G. A.; TASCA, T. Analysis of the NTPDase and ecto-5'-nucleotidase profiles in serum-limited *Trichomonas vaginalis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 170-177, 2012a.
- FRASSON, A. P.; DE CARLI, G. A.; BONAN, C. D.; TASCA, T. Involvement of purinergic signaling on nitric oxide production by neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*, v. 8, p. 1-9, 2012b.
- FRASSON, A. P.; VIEIRA, P. B.; TASCA, T. Involvement of Extracellular ATP and Derivates in *Trichomonas vaginalis* Infection. In: KUESTER, E.; TRAUGOTT, G. (Ed.). *Adenosine Triphosphate Chemical Properties, Biosynthesis and Function in Cells*. New York: Nova Science Publishers, 2013. p. 187-195.
- 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.; 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.
- 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.
- GOODMANN, R. P.; GHABRIAL, S. A.; FICHOROVA, R. N.; NIBERT, M. L. Trichomonasvirus: a new genus of protozoan viruses in the family Totiviridae. *Archives of Virology*, 2011; v. 156, p. 171-179, 2011.
- HARP, D. F.; CHOWDHURY, I. Trichomoniasis: evaluation to execution. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 157, p. 3-9, 2011.
- HARRIS, D. I.; BEECHEY, R. B.; LINSTED, D.; BARRETT, J. Nucleoside uptake by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 29, p. 105-106, 1988.
- HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*, v. 25, p. 33-39, 2004.
- 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.; 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.
- HOBBS, M. M.; SEÑA, A. C. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sexually Transmitted Infections*, v. 89, p. 434-438, 2013.
- JOHNSTON, V.J.; MABEY, D.C. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infectious Disease*, v. 8, p. 56–64, 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.

- KISSINGER, P.; ADAMSKI, A. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. *Sexually Transmitted Infections*, v. 89, p. 426-433, 2013.
- KLEBANOFF, M. A.; CAREY, J. C.; HAUTH, J. C.; HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; THOM, E. A.; et al. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *The New England Journal of Medicine*, v. 345, p. 487-493, 2001.
- KNOWLES, A. F. The GDA1\_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. *Purinergic Signaling*, v. 7, p. 21-45, 2011.
- KOZAKIEWICZ, A.; NEUMANN, P.; BANACH, M.; KOMOSZYNSKI, m.; WOJTCZAK, A. Modeling studies of potato nucleoside triphosphate diphosphohydrolase NTPDase1: an insight into the catalytic mechanism. *Acta Biochimica Polonica*, v. 55, p. 141–150, 2008.
- 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. The proteins secreted by *Trichomonas vaginalis* and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65. *Cell Microbiology*, v. 9, p. 2586–2597, 2007.
- KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 199-212, 1999.
- LAND, K. M.; WRISCHNIK, L. A. Basic biology of *Trichomonas vaginalis*: current explorations and future directions. *Sexually Transmitted Infections*, v. 89, p. 416-417, 2013.
- LEE, A. Y. D.; PHANC, T. K.; HULETTC, M. D.; KÖRNER, H. The relationship between CCR6 and its binding partners: Does the CCR6–CCL20 axis have to be extended? *Cytokine*, v. 72, p. 97-101, 2015.
- LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Biology of trichomonosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 13, p. 37-45, 2000.
- 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.
- LUSHBAUGH, W. B.; TURNER, A. C.; GENTRY, G. A.; KLYKKEN, P. C. Characterization of a secreted cytoactive factor from *Trichomonas vaginalis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 41, p. 18-28, 2011.

- 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.
- MARIOTINI-MOURA, C.; BASTOS, M.S.; DE CASTRO, F.F.; TRINDADE, M.L.; DE SOUZA VASCONCELOS, R.; NEVES-DO-VALLE, M.A.; et al. *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. *Acta Tropica*, v. 130, p. 140-147, 2014.
- 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.
- 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.
- MÜLLER, M. The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology*, v. 139, p. 2879- 2889, 1993.
- MUNAGALA, N. R.; WANG, C. C. Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 127, p. 143-149, 2003.
- MUSNY, C. A.; SCHWEBKE, J. R. The clinical spectrum of *Trichomonas vaginalis* infection and challenges to management. *Sexually Transmitted Infections*, v. 89, p. 423-425, 2013.
- NAM, Y. H.; MIN, A.; KIM, S. H.; LEE, Y. A.; KIM, K. A.; SONG, K. J.; SHIN, M. H. Leukotriene B(4) receptors BLT1 and BLT2 are involved in interleukin-8 production in human neutrophils induced by *Trichomonas vaginalis*-derived secretory products. *Inflammation Research*, v. 61, p. 97-102, 2012.
- NAM, Y. H.; MIN, D.; KIM, H. P.; SONG, K. J.; KIM, K. A.; LEE, Y. A.; KIM, S. H.; SHIN, M. H. Leukotriene B4 receptor BLT-mediated phosphorylation of NF-κB and CREB is involved in IL-8 production in human mast cells induced by *Trichomonas vaginalis*-derived secretory products. *Microbes and Infections*, v. 13, p. 1211-1220, 2011.

- 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.
- 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.
- PANT, S.; HILTON, H.; BURCZYNSKI, M. E. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochemical Pharmacology*, v. 83, p. 1484–1494, 2012.
- PEREIRA-NEVES, A.; BENCHIMOL, M. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biology of the Cell*, v. 99, p. 87-101, 2007.
- PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, p. 300-317, 1998.
- PINHEIRO, C. M.; MARTINS-DUARTE, E. S.; FERRARO, R. B.; FONSECA DE SOUZA A. L.; GOMES, M. T.; LOPES, A. H.; et al. *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Experimental Parasitology*, v. 114, p. 16–25, 2006.
- POOLE, D. N.; MCCLELLAND, R. S. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*, v. 89, p. 418-422, 2013.
- QUINLIVAN, E. B.; PATEL, S. N.; GRODENSKY, C. A.; GOLIN, C. E.; TIEN, H. C.; HOBBS, M. M. Modeling the impact of *Trichomonas vaginalis* infection on HIV transmission in HIV-infected individuals in medical care. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 39, p. 671-677, 2012.
- 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.
- RYAN, C. M.; MEHLERT, A.; RICHARDSON, J. M.; FERGUSON, M. A.; JOHNSON, P. J. Chemical structure of *Trichomonas vaginalis* surface lipoglycan: a role for short galactose ( $\beta$ 1-4/3) N-acetylglucosamine repeats in host cell interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 28, p. 40494-40508, 2011.

- 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.
- SANSOM, F. The role of the NTPDase enzyme family in parasites: what do we know, and where to from here? *Parasitology*, v. 139, p. 963-980, 2012.
- SANSOM, F.M.; RALTON, J. E.; SERNEE, M.F.; COHEN, A.M.; HOOKER, D.J.; HARTLAND, E.L. et al. *Leishmania major* is required for lipophosphoglycan elongation and normal lesion development whereas secreted NTPDase2 is dispensable for virulence. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 8, p. e3402, 2014.
- SANTOS, R. F.; POSSAN, M. A.; BASTOS, M. S.; GUEDES, P. M. M.; ALMEIDA, M.; DE MARCO, R.; et al. Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 3, p. e387, 2009.
- SCHMIDT, A. P.; LARA, D. R.; SOUZA, D. O. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 116, p. 401-416, 2007.
- SCHWEBKE, J.R.; BARRIENTES, F. J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 4209-4210, 2006.
- SCHWEBKE, J.R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, p. 794–803, 2004.
- SCHUTYSER, E.; STRUYFM S.; VAN DAMME, J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 14, p. 409–426, 2003.
- SECOR, W. E. *Trichomonas vaginalis*: treatment questions and challenges. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 10, p. 107-109, 2012.
- SHAIQ, M. F.; LIN, P. R.; LEE, C. S.; HOU, S. C.; TANG, P.; YANGA, K. D. Novel neutrophil-activating factor released by *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, v. 60, p. 4475-4482, 1992.
- SMITH, A.; JOHNSON, P. Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Research in Microbiology*, v. 162, p. 646-654, 2011.

- SONG, H. O.; RYU, J. S. Superoxide Anion Production by Human Neutrophils Activated by *Trichomonas vaginalis*. *Korean Journal of Parasitology*, v. 51, p. 479-484, 2013.
- SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and Africans. *Emerging Infectious Disease*, v. 7, p. 927-932, 2001.
- SUTAK, R.; DOLEZAL, P.; FIUMERA, H. L.; HRDY, I.; DANCIS, A.; DELGADILLO-CORREA, M.; JOHNSON, P. J.; MÜLLER, M.; TACHEZY, J. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 28, p. 10368-10373, 2004.
- SUTCLIFFE, S. Sexually transmitted infections and risk of prostate cancer: review of historical and emerging hypotheses. *Future Oncology*, v. 6, p. 1289-12311, 2010.
- TASCA, T.; BONAN, C. D.; DE CARLI, G. A.; BATTASTINI, A. M.; SARKIS, J. J. Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (E.C 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Parasitology*, v. 105, p. 167-173, 2003.
- TASCA, T.; BONAN, C. D.; DE CARLI, G. A.; SARKIS, J. J. *Trichomonas vaginalis*: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability. *Parasitology Research*, v. 93, p. 300-303, 2004.
- THURMAN, A. R.; DONCEL, G. F. Innate immunity and inflammatory response to *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis: relationship to HIV acquisition. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 65, p. 89-98, 2011.
- TWU, O.; DE MIGUEL, N.; LUSTIG, G.; STEVENS, G. C.; VASHISHT, A. A.; WOHLSCHLEGEL, J. A.; JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host:parasite interactions. *Plos Pathogens*, v. 9, p. 1-14, 2013.
- 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.
- WANG, A. L.; WANG, C. C. Viruses of the protozoa. *Annual Review of Microbiology*, v. 45, p. 251-263, 1991.
- WEIZENMANN, M.; FRASSON, A. P.; DE BARROS, M. P.; VIEIRA, P. B.; ROSEMBERG, D. B.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D.; TASCA, T. Kinetic characterization and gene expression of adenosine deaminase in intact

trophozoites of *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 319, p. 115-124, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections – 2008, [apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf). World Health Organization, Geneva, 2012.

XIAO, J. C.; XIE, L. F.; FANG, S. L.; GAO, M. Y.; ZHU, Y.; SONG, L. Y.; et al. Symbiosis of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* may link metronidazole resistance *in vitro*. *Parasitology Research*, v. 100, p. 123-130, 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.

ZHELTVAI, O. I.; ZHELTVAI, I. I.; SPINUL, V. V.; ANTONOVICH, V. P. Spectrophotometry Determination of Metronidazole and Tinidazole by Their Complexation with Copper(II). *Journal of Analytical Chemistry*, v.68, p. 600-605, 2013.





III. 5. Anexo



**Artigos Científicos Publicados no Período de Vigência do Doutorado  
(março 2011-março 2015)**

**1. Natural green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria.**

Trentin DS, Silva DB, Frasson AP, Rzhepishevskaya O, da Silva MV, de L Pulcini E, James G, Soares GV, Tasca T, Ramstedt M, Giordani RB, Lopes NP, Macedo AJ.

*Scientific Reports*, 6: 5:8287, 2015. doi: 10.1038/srep08287

**2. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation.**

Silva LN, Trentin Dda S, Zimmer KR, Treter J, Brandelli CL, Frasson AP, Tasca T, Silva AG, Silva MV, Macedo AJ.

*Pharmaceutical Biology*, 53: 464-8, 2015. doi: 10.3109/13880209.2014.922587

**3. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity from triterpenoid derivatives.**

Innocente AM, Vieira Pde B, Frasson AP, Casanova BB, Gosmann G, Gnoatto SC, Tasca T.

*Parasitology Research*, 113: 2933-40, 2014. doi: 10.1007/s00436-014-3955-0

**4. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of marine-associated fungi from the South Brazilian Coast.**

Scopel M, dos Santos O, Frasson AP, Abraham WR, Tasca T, Henriques AT, Macedo AJ.

*Experimental Parasitology*, 133: 211-6, 2013. doi: 10.1016/j.exppara.2012.11.006

**5. First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga.**

Frasson AP, dos Santos O, Duarte M, da Silva Trentin D, Giordani RB, da Silva AG, da Silva MV, Tasca T, Macedo AJ.

*Parasitology Research*, 110: 2581-7, 2012. doi: 10.1007/s00436-011-2787-4

**6. Kinetic characterization and gene expression of adenosine deaminase in intact trophozoites of *Trichomonas vaginalis*.**

Weizenmann M, Frasson AP, de Barros MP, Vieira Pde B, Rosemberg DB, De Carli GA, Bogo MR, Bonan CD, Tasca T.

*FEMS Microbiology Letters*, 319: 115-24, 2011. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02283.x