

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

Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase e ecto-5'-nucleotidase de *Trichomonas vaginalis*: metabolismo dos nucleotídeos e nucleosídeo da guanina, efeito na citotoxicidade e modulação da atividade anti-*T. vaginalis* de floroglucinois

CAMILA BRAZ MENEZES

PORTO ALEGRE, 2016

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

Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase e ecto-5'-nucleotidase de *Trichomonas vaginalis*: metabolismo dos nucleotídeos e nucleosídeo da guanina, efeito na citotoxicidade e modulação da atividade anti-*T. vaginalis* de floroglucinois

Tese apresentada por **Camila Braz Menezes** para
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dr. Tiana Tasca

PORTO ALEGRE, 2016

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 27/09/2016 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Carla Denise Bonan
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Braz Menezes, Camila

Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase e ecto-5'-nucleotidase de *Trichomonas vaginalis*: metabolismo dos nucleotídeos e nucleosídeo da guanina, efeito na citotoxicidade e modulação da atividade anti-T. *vaginalis* de floroglucinois / Camila Braz Menezes. -- 2016.

179 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, 2016.

1. *Trichomonas vaginalis*. 2. ectonucleotidases. 3. guanosina. 4. células epiteliais vaginais. 5. derivados de floroglucinol . I. Tasca, Tiana , orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

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 em colaboração com o Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e com o Instituto do Petróleo e Gás Natural da Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES durante parte do desenvolvimento da tese.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, instituição da qual faço parte há 10 anos e que me proporcionou um ensino sólido e uma formação acadêmica que me enche de orgulho.

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

À Prof^ª. Dr. Tiana Tasca, meu agradecimento mais do que especial, por me aceitado para ser sua aluna de doutorado, tendo me conhecido apenas como monitora e aluna de TCC. Agradeço infinitamente a confiança, a acolhida, a atenção e dedicação depositadas em mim durante todo meu período de pós-graduação. Obrigada pelo incentivo, pelo otimismo constante e por sempre acreditar que tudo dá certo e que somos capazes de superar dificuldades. Tiana é meu maior exemplo de dedicação, profissionalismo e amor em fazer o que se ama. Obrigada pela amizade construída e por ser essa pessoa tão especial.

Aos meus amados colegas e amigos do Laboratório de Pesquisa em Parasitologia – Amanda, Brenda, Dariana, Fernanda, Graziela, Lúcia, Márcia, Nícolas, Odelta e Patrícia. Agradeço a oportunidade de conviver com vocês diariamente, dividindo o trabalho, estudo, discussões, cálculos de protocolos, muuuuuito café e chocolate e inesquecíveis momentos de alegria. Obrigada por me acolherem nesse laboratório tão agregador, por me ensinarem tudo o que sei hoje, pelas discussões, pelas contribuições no desenvolvimento desta tese e pela nossa amizade. Um agradecimento especial à Márcia que foi minha fiel companheira na reta final.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Alexandre Macedo, pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho, pela convivência e pelos momentos de descontração.

Aos colaboradores que participaram desta tese, especialmente ao Dr Luis Frederico Rodrigues, do Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais da PUCRS, por abraçar a nossa ideia e auxiliar na execução dessa parceria de sucesso.

Agradeço também ao grupo de pesquisa da Prof^ª. Dr. Solange Garcia, pela disponibilidade e auxílio nos experimentos de HPLC.

À Prof^ª. Dr. Gilsane Lino Von Poser pela parceria na realização do estudo dos floroglucinois e pela disponibilidade em discutir os resultados, e em especial ao doutorando Henrique Bridi por sempre realizar o milagre da multiplicação dos compostos.

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, incentivo e pelos momentos de descontração. Um agradecimento especial às amigas que conheci na Graduação e que me acompanham desde então - Fê, Jose, Mari e Tabi. Um agradecimento especial também a Ana e a Vivi minhas chefinhas de tempos de camundongos e que se tornaram companhias preciosas.

Ao Thiago, pelo incentivo constante, pela compreensão, pela paciência, por me apoiar e acreditar em mim sempre e me transmitir tranquilidade. Obrigada pelo amor e companheirismo destes 10 anos de convivência. À família do Thiago meu agradecimento por seu também a minha família, em especial a Fê, Pedro e Eduardo.

À minha família, pelo companheirismo, apoio, pelo constante incentivo e por sempre acreditarem nas minhas decisões. Ao Matheus e a Clarissa por serem meus companheiros de vida e de história e pelos exemplos pessoais e profissionais que respresentam para mim e à minha cunhada Amorety e ao meu cunhado Luiz por terem tornado essa família ainda mais especial. Em especial, aos meus pais Adão e Rosa pela infinita dedicação, pelos valores transmitidos, pelas renúncias e pelo amor gigante e incondicional. Ao meu pai, tenho certeza que está muito orgulhoso do que me tornei e olhando para o meu caminho. Obrigada a todos por tanto amor e felicidade.

“The real voyage of discovery consists not in seeking new landscapes, but in having new eyes.”

Marcel Proust

RESUMO

Trichomonas vaginalis é o protozoário flagelado que parasita o sistema urogenital humano causando a tricomoníase, a doença sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo, sendo registrados aproximadamente 276 milhões de novos casos a cada ano. O sucesso da colonização das células hospedeiras e desenvolvimento da infecção envolve um complexo processo que culmina em citoaderência e citotoxicidade. Nucleotídeos e nucleosídeos são liberados para o espaço extracelular por células em situações de estresse ou lesão tecidual e desencadeiam seus efeitos sinalizadores através da ativação de purinoceptores. Ainda, a hidrólise sequencial de nucleotídeos pelas ectonucleotidases, nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) e ecto-5'-nucleotidase leva à formação de nucleosídeos que são essenciais para o metabolismo de purinas do parasito. Efeitos antagônicos são desencadeados por nucleotídeos e nucleosídeos, respectivamente próinflamatórios e anti-inflamatórios, na mediação de respostas imunes. A atividade dessas enzimas sobre os nucleotídeos da guanina e o efeito de restrição metabólica sobre a hidrólise de nucleotídeos foi avaliada. Além disso, a participação da sinalização mediada pelos nucleotídeos e nucleosídeos também foi avaliada em um modelo de citotoxicidade. Os resultados demonstram que os nucleotídeos GTP, GDP e GMP são substratos para as ectonucleotidases de *T. vaginalis* com parâmetros cinéticos compatíveis para enzimas dessa família. A condição de restrição de soro aumentou a atividade da NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase e o aumento da expressão gênica das *TvNTPDase 2* e *4* pode justificar o aumento da atividade. A recaptção de guanosina extracelular foi menor do que a recaptção de adenosina, demonstrada pela razão isotópica C^{12}/C^{13} no nucleosídeo detectada no DNA dos parasitos. A fim de investigar um possível papel biológico para o acúmulo de guanosina extracelular, bem como avaliar o envolvimento da sinalização purinérgica na citotoxicidade mediada pelo parasito, diferentes isolados de *T. vaginalis* foram testados frente à capacidade de promover citólise. Todos os isolados foram capazes de promover efeito citolítico em alguma proporção, com destaque para o isolado TV-LACM6, que apresenta um perfil de hidrólise ATP, GTP >

AMP > GMP. Quando nucleotídeos e nucleosídeos foram testados, o efeito citotóxico produzido pelo isolado foi potencializado na presença de ATP e GTP. Por outro lado, o efeito foi revertido na presença de eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina (EHNA), um inibidor da adenosina deaminase. Importante, guanosina não foi capaz de reverter o efeito citotóxico produzido pelos trofozoítos, resultado que corrobora com o perfil de hidrólise de nucleotídeos e acúmulo de guanosina extracelular, sendo uma vantagem para o parasito. A possível participação dos receptores de adenosina foi avaliada, entretanto os receptores ADORA1 e ADORA2A não parecem estar envolvidos no efeito protetor mediado pela adenosina. Considerando o potencial farmacológico desempenhado por essas enzimas no metabolismo de purinas em protozoários bem como no controle de respostas imunes, a modulação da hidrólise de nucleotídeos pode ser um alvo terapêutico importante e representar um mecanismo sinérgico na atividade antiparasitária de compostos ativos. Nesse sentido, o estudo demonstrou a atividade anti-*T. vaginalis* de três compostos, e em especial o isoastrobrasilol B, com IC₅₀ de 38 µM. O composto não apresentou efeitos hemolíticos frente a eritrócitos humanos e apesar de ter demonstrado efeito citotóxico *in vitro* frente à linhagem de células epiteliais vaginais humanas (HMVII), nenhuma citotoxicidade foi demonstrada no modelo *in vivo*. Isoastrobrasilol B foi o único composto que inibiu significativamente as atividades da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase e o efeito imune atribuído ao acúmulo extracelular de nucleotídeos foi avaliado. A produção de espécies reativas de oxigênio e interleucina-6 (IL-6) por neutrófilos estimulados por *T. vaginalis* não foi afetada pelo tratamento com o composto. Por outro lado, a liberação de interleucina-8 (IL-8), a principal interleucina produzida por neutrófilos na tricomoníase, foi aumentada. O efeito sinérgico de redução de viabilidade de trofozoítos e modulação da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase pode aumentar a suscetibilidade do *T. vaginalis* frente à resposta imune do hospedeiro e conseqüentemente, sua eliminação do sítio de infecção.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*, sinalização purinérgica, ectonucleotidases, guanosina, células epiteliais vaginais, derivados de floroglucinol.

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is a flagellate protozoan that parasitizes the human urogenital tract causing trichomoniasis, the most common non-viral sexually transmitted disease, infecting approximately 276 million people worldwide annually. To achieve success in parasitism trichomonads develop a complex process against the host cells that culminate in cytoadherence and cytotoxicity. Nucleotides and nucleosides 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, nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) and ecto-5'-nucleotidase, are capable of hydrolyzing the nucleotides producing nucleosides that are essential to the parasite purine metabolism. The enzymatic cascade mediated by ectonucleotidases is relevant in controlling nucleotides and nucleosides levels as these molecules play antagonistic roles in inflammation, as proinflammatory and anti-inflammatory mediators, respectively. This study investigated the hydrolysis profile of guanine nucleotides in *T. vaginalis* as the effect of serum limitation condition in the enzymatic cascade. Furthermore, we investigated the influence of extracellular nucleotides and nucleosides on the modulation of the host cell cytotoxicity mediated by *T. vaginalis*. Results show that guanine nucleotides GTP, GDP, GMP are substrates for *T. vaginalis* ectonucleotidases, with expected kinetic parameters for this enzyme family. The metabolic restriction condition enhanced NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities and the highest gene expressions found for *TvNTPDase 2* and *4* which may explain the enzymatic activity enhance. The extracellular guanosine uptake was lower than that observed for adenosine into parasite DNA measured by isotopic ratio C^{12}/C^{13} of the nucleosides. In order to investigate the possible biological role for extracellular guanosine accumulation as well as to evaluate the involvement of purinergic signaling in the cytotoxicity promoted by the parasite, a collection of *T. vaginalis* isolates were tested against a human epithelial vaginal cell line (HMVII).

Fresh clinical *T. vaginalis* isolates produced cytolytic effect against human vaginal epithelial cells in a heterogeneous profile. The most cytotoxic isolate, TV-LACM6, presents the hydrolysis profile ATP, GTP > AMP > GMP. When the nucleotides and nucleosides were tested, the cytotoxic effect elicited by TV-LACM6 was increased in presence of nucleotides ATP and GTP. In contrast, the cytotoxicity was reversed by adenosine in presence of erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine (EHNA), but not by guanosine, which is in agreement with the accumulation of extracellular guanosine and the hydrolysis profile, acting as an advantage for the parasite. ADORA1 and ADORA2A are not involved in the protective mechanism of adenosine. Considering the pharmacological potential that ectonucleotidases play in the context of purine metabolism and in the immune response modulation, nucleotide hydrolysis may represent a therapeutic target as an additional mechanism in association with anti *T.vaginalis* compounds. The study demonstrated promising activities for three derivatives with isoastrobrasilol B the most active compound with IC₅₀ 38 μM. The compound did not demonstrate any hemolytic activity and although induced cytotoxicity against human epithelial vaginal cells (HMVII), absence of toxicity was obtained when *in vivo* model was studied. Isoastrobrasilol B was the only compound that significantly inhibited NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities and the immune modulation attributed to extracellular nucleotide accumulation was evaluated. Reactive oxygen species production and interleukin-6 (IL-6) release by *T.vaginalis* stimulated neutrophils were not affected by phloroglucinol treatment. On the other hand, interleukin-8 (IL-8), the primary cytokine produced by neutrophils during trichomoniasis, was significantly enhanced. The associative mechanism of trophozoites death and NTPDase and ecto-5'-nucleotidase modulation may increase the susceptibility of *T. vaginalis* to host immune responses and, consequently, the elimination from the infection site.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, purinergic signalling, ectonucleotidases, guanosine, epithelial vaginal cells, phloroglucinol derivatives.

LISTA DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO

Figura 1 - Representação da topografia dos receptores purinérgicos P1 e P2 54

Figura 2 - Esquema das vias de salvação de purinas em *T. vaginalis* 63

II. CAPÍTULO II.1

Figure 1. Effect of bovine serum limitation [1% heat-inactivated bovine serum (HIBS)] on *T. vaginalis* NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in *T. vaginalis* 82

Figure 2. GTP hydrolysis and product formation by *T. vaginalis* after bovine serum limitation [1% heat-inactivated bovine serum (HIBS)] 83

Figure 3. ¹³C/¹²C isotopic ratio in the samples and controls and differences in the ratio between the control (10% HIBS) and sample (1% HIBS) are reported in parts per thousand or per mil ‰ 85

III. CAPÍTULO II.2

Figure 1: Cytolysis of human vaginal epithelial cells induced by different *Trichomonas vaginalis* isolates 100

Figure 2: Regulation of cytolysis of human vaginal epithelial cells induced by TV-LAC M6 in different conditions 101

IV. CAPÍTULO II.3

Figure 1: Chemical structures of the eleven phloroglucinol derivatives screened for anti *T. vaginalis* activity 123

Figure 2: Anti-*T. vaginalis* activity of phloroglucinol derivatives against ATCC 30236 124

Figure 3: Kinetic growth curve of trophozoites treated with isoastrobrasilol B at IC ₅₀ concentration (38 μM) in comparison to untreated parasites (control) and parasites with 0.6 % DMSO (vehicle)	125
Figure 4: Effect of phloroglucinol derivatives isoastrobrasilolB, isohyprebrasilol B and isouliginosin B on <i>T. vaginalis</i> NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities	126
Figure 5: Effect of isoastrobrasilol B at IC ₅₀ concentration on ROS and interleukynes IL-6 and IL-8 production by neutrophils stimulated with <i>T. vaginalis</i>	127

LISTA DE TABELAS

I. CAPÍTULO II.1

Table 1: Kinetic parameters of the NTPDase and ecto-5'-nucleotidase reactions.....	82
Table 2: NTPDase and ecto-5-nucleotidase activities among different <i>T. vaginalis</i> isolates	82
Table 3: Effects of inhibitors on GTP, GDP, and GMP hydrolysis by <i>T. vaginalis</i> ATCC30236	84
Table 4: Relative expression of TvNTPDase1-5 in <i>T. vaginalis</i> trophozoites cultured under 1.0% HIBS when compared with parasites cultured with 10% HIBS (control)	84

II. CAPÍTULO II.2

Table 1: <i>T. vaginalis</i> TV-LACM6 isolate NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities	104
--	------------

III. CAPÍTULO II.3

Table 1 IC ₅₀ values of the three phloroglucinol derivatives that presented the highest activities against <i>T. vaginalis</i> ATCC30236 trophozoites	130
Table 2 Hemolytic activity at IC ₅₀ concentration of the three phloroglucinol derivatives that presented the highest activities against <i>T. vaginalis</i> ATCC30236 trophozoites.....	130
Table 3 Antiprotozoal and cytotoxic activity of the three phloroglucinol derivatives that presented the highest activities against <i>T. vaginalis</i> ATCC30236 trophozoites	130

LISTA DE ABREVIATURAS

DST: Doença Sexualmente Transmissível

PNP: Purina Nucleosídeo Fosforilase

PNK: Purina Nucleosídeo Cinase

OMS: Organização Mundial da Saúde

FDA: Food and Drug Administration

HIV: Human immunodeficiency virus

CEVs: Células epiteliais vaginais

CEPs: células epiteliais prostáticas

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

ROS: Reative oxygen species

ACRs: Regiões Conservadas da Apirase

DAMPs: Padrões Moleculares Associados ao Dano

E-NTPDase: Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase

EHNA: erythro-9- (2-Hydroxy-3-nonyl) adenine hydrochloride

ADA: Adenosina Deaminase

ADORA1: Receptor A1 de adenosina

ADORA2: Receptor A2 de adenosina

LDH: Lactato Desidrogenase

SUMÁRIO

PARTE I

I.1. Introdução.....	28
I.2 Estado da Arte.....	34
I.2.1. Artigo de Revisão: “Trichomoniasis – are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide”?	37
I.2.2. Sinalização Purinérgica.....	52
I.2.3. Derivados de Floroglucinol.....	68
I.3 Objetivos.....	72

PARTE II

II. Artigo Científicos.....	
II.1. CAPÍTULO 1 – “<i>Trichomonas vaginalis</i> NTPDase and ecto-5'-nucleotidase hydrolyze guanine nucleotides and increase extracellular guanosine levels under serum restriction”. Artigo publicado no periódico Molecular and Biochemical Parasitology.....	78
II.2. CAPÍTULO 2 – Adenosine, but not guanosine, protects vaginal epithelial cells from <i>Trichomonas vaginalis</i> cytotoxicity. Manuscrito a ser submetido ao periódico Microbes and Infection.....	88

II.3. CAPÍTULO 3 - Modulation of extracellular nucleotides hydrolysis as an additional mechanism for the anti-<i>Trichomonas vaginalis</i> activity of phloroglucinol derivative isoaustribrasilol B. Manuscrito a ser submetido ao periódico <i>Parasitology</i>.....	104
---	------------

PARTE III

III. 1. Discussão Geral.....	133
III. 2. Conclusões Gerais.....	146
III. 3. Perspectivas.....	154
III. 4. Referências.....	158
III. 5. Anexo.....	167

PARTE I

No decorrer das últimas duas décadas, impulsionadas principalmente pelo advento da epidemia da AIDS (do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*), as doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), historicamente negligenciadas e pouco estudadas no Brasil, readquiriram importância no contexto dos serviços de saúde pública. Apesar da necessidade crescente do conhecimento dessas doenças, alguns fatores negativos têm sido percebidos no contexto da resolução às DSTs no Brasil, como a falta de dados epidemiológicos, visto que somente AIDS, sífilis congênita e gestacional são de notificação compulsória, e em especial, a dificuldade no acesso ao diagnóstico e ao tratamento decorrentes da carência de recursos financeiros em saúde no nosso país.

A tricomoníase representa a DST não viral mais frequente no mundo. 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 relatados 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 tricomoníase é uniformemente distribuída entre mulheres e homens sexualmente ativos de todas as faixas etárias (MUZNY & SCHWEBKE, 2013). Os dados do Ministério da Saúde referentes à prevalência da tricomoníase no Brasil estimam uma prevalência de 15%, entretanto esses dados podem ser subestimados e variam de acordo com a região avaliada (SAÚDE, 2005). Notavelmente, a tricomoníase afeta desproporcionalmente as populações desfavorecidas e de baixa renda de países em desenvolvimento, o que contribui para sua classificação como uma infecção parasitária negligenciada, apesar da crescente consciência do seu impacto para a saúde pública (SECOR et al., 2014).

Além das manifestações clínicas, a persistência e cronicidade da infecção acarretam sérias consequências para a saúde, tornando ainda mais relevante o correto diagnóstico e tratamento. As complicações causadas pela infecção pelo *T. vaginalis* incluem gestação com ruptura prematura de bolsa amniótica, trabalho

de parto prematuro e baixo peso do recém-nascido (COTCH et al., 1997), predisposição ao câncer cervical (VIKKI et al., 2000) e de próstata (SUTCLIFFE et al., 2012) e doença inflamatória pélvica (CHERPES et al., 2006). Ainda mais relevante é a associação entre a presença do parasito e o aumento do risco a outras DSTs, notadamente na transmissão e aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*). Estudos demonstram que a infecção pelo *T. vaginalis* aumenta de 1,5 a 2,7 vezes o risco de aquisição e transmissão do vírus e até quatro vezes o risco de excreção do vírus das células hospedeiras para o ambiente vaginal (WANG et al., 2001; VAN DER POL et al., 2008). Diante da problemática relacionada à persistência e cronificação da doença torna-se crucial o acesso dos pacientes aos sistemas de saúde para o adequado diagnóstico, tratamento e cura da infecção.

O tratamento da tricomoníase está restrito ao uso dos fármacos da classe dos nitroimidazóis, metronidazol e tinidazol, únicos agentes antimicrobianos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*, USA). Apesar de, em particular, o metronidazol ser uma opção terapêutica efetiva, com baixo custo, disponível nos sistemas de saúde públicos, alguns pacientes podem apresentar reações adversas e de hipersensibilidade. O tratamento da tricomoníase enfrenta ainda outra relevante limitação, o crescimento de casos de infecções por *T. vaginalis* com resistência a essa classe de agentes antimicrobianos, chegando a taxas próximas a 10% (SCHWEBKE & BARRIENTES, 2006). Os custos associados ao tratamento e cuidados em saúde relacionados à tricomoníase nos Estados Unidos são substanciais e estão estimados em 24 milhões de dólares por ano. O custo médio por paciente diagnosticado da DST foi estimado em 22 dólares, não incluindo quaisquer custos associados com complicações ou condições associadas à infecção (OWUSU-EDUSEI et al., 2013). Os custos podem atingir alarmantes 167 milhões de dólares ao ano quando se atribuem as complicações atribuídas à facilitação da aquisição e transmissão do vírus HIV (CHESSON et al., 2004). Frente às dificuldades encontradas diante das opções terapêuticas disponíveis para o tratamento da tricomoníase, torna-se essencial que os aspectos bioquímicos do parasito e os mecanismos de patogenicidade

envolvidos na interação parasito-hospedeiro sejam investigados, a fim de contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento da DST.

Nesse contexto, o estudo da sinalização purinérgica pode representar uma importante ferramenta na investigação de aspectos bioquímicos e moleculares envolvidos na interação parasito-hospedeiro e consequente desenvolvimento ou resolução da infecção. Esse sistema envolve a liberação extracelular de nucleotídeos e sua ação em receptores específicos, os purinoceptores. Os níveis extracelulares dessas moléculas são regulados por enzimas denominadas ectonucleotidases. Esta rede de sinalização purinérgica está envolvida na modulação do sistema imune na célula hospedeira, na obtenção e manutenção de nucleosídeos para suprir as demandas de purinas para o crescimento dos patógenos e ainda na modulação de citotoxicidade (SANSOM et al., 2008b). Esse sistema já está descrito em diferentes protozoários, como por exemplo, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Tritrichomonas foetus* e em *T. vaginalis* a caracterização enzimática das NTPDases, ecto-5'-nucleotidase e adenosina deaminase já está descrita (MATOS et al., 2001; TASCA et al., 2003; WEIZENMANN et al., 2011). A modulação desse sistema de sinalização celular pode ser uma valiosa ferramenta no estudo de eventos fisiológicos, bioquímicos e imunológicos na interação parasito-hospedeiro. A modulação dessa via enzimática por compostos ativos frente ao *T. vaginalis* pode representar um mecanismo adjuvante ao tratamento tradicional da tricomoníase, hoje restrito a uma única classe de fármacos que apresenta limitações bastante consideráveis.

A seção “Estado da Arte” está apresentada na seguinte forma:

O **Capítulo I.2.1** é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 32 – 46.

Camila Braz Menezes, Amanda Piccoli Frasson, Tiana Tasca. **Trichomoniasis – are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide?** Microbial Cell, pp.-

RESUMO DO CAPÍTULO

Trichomonas vaginalis é o agente etiológico da tricomoníase, a doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais frequente no mundo. A tricomoníase é transmitida por relações sexuais e a transmissão via fômites é rara. Epidemiologia, incidência e prevalência: A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima uma incidência de 276 milhões de novos casos por ano e prevalência de 187 milhões de indivíduos infectados. No Brasil, os dados são estimados em 15% de prevalência da infecção. No entanto, a infecção não é de notificação obrigatória, o que pode tornar os dados de prevalência e incidência subestimados. A infecção pelo *T. vaginalis* resulta em uma variedade de manifestações clínicas - na maioria dos casos, os pacientes são assintomáticos, mas alguns podem desenvolver sinais normalmente associados com a doença. A infecção quando não tratada é associada a importantes consequências para a saúde como câncer cervical e de próstata, efeitos adversos durante a gravidez, infertilidade e ainda mais relevante são os estudos que demonstram que a tricomoníase está associada ao aumento da transmissão e aquisição do vírus HIV (*human immunodeficiency virus*). O *T. vaginalis* desenvolveu um processo complexo de colonização da célula hospedeira, envolvendo um processo de citopatogenicidade que inclui mecanismos dependentes e independentes de contato.

Esse mecanismo multifatorial envolve proteinases, adesinas de superfície, fatores líticos e o lipofosfoglicano (glicoconjugado abundante da superfície do parasito) que culminam em citoaderência e citotoxicidade frente às células hospedeiras.

O tratamento é restrito aos fármacos da classe dos nitroimidazois, sendo o metronidazol e o tinidazol os únicos fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Além das opções terapêuticas restritas, o tratamento apresenta limitações devido a não adesão, reinfeção, ausência de tratamento de parceiros sexuais, diagnósticos imprecisos e devido ao aumento do número de isolados clínicos resistentes à terapêutica. Nesse sentido, novas alternativas terapêuticas com mecanismos de ação inovadores são urgentemente necessárias.

As estratégias de prevenção contra a infecção incluem medidas de comportamento sexual, uso de preservativos e educação para controle de doenças sexualmente transmissíveis. Essas abordagens tradicionais não têm contribuído para a redução da prevalência da doença, apontando para a necessidade de medidas inovadoras. O desenvolvimento de vacinas tem sido dificultado pela falta de modelos animais associados à limitação da ausência de imunidade humoral persistente após o curso da infecção.

A ausência de avanços no desenvolvimento de novos fármacos, métodos diagnósticos e vacinas, provavelmente reflete o desconhecimento acerca das graves consequências da doença bem como da ausência de casos fatais associados à infecção. Idealmente um esforço colaborativo de pesquisadores deve se concentrar em estudos sobre a biologia e patogênese do *T. vaginalis*, a melhoria nos métodos de diagnóstico e de detecção de resistência aos fármacos.

I.2.2. Sinalização Purinérgica

I.2.3. Derivados de Floroglucinol

I.2.2 Sinalização Purinérgica

O sistema purinérgico é uma rede de sinalização celular que desempenha diversos efeitos biológicos nos organismos através dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares. Embora os nucleotídeos como o ATP tenham funções intracelulares classicamente descritas, especialmente em relação ao metabolismo energético, essas moléculas são liberadas para o meio extracelular através de diversos mecanismos (BURNSTOCK & BOEYNAEMS, 2014). Uma vez liberadas, atuam na regulação de uma série de processos biológicos, incluindo função cardíaca, neurotransmissão, contração muscular, vasodilatação, metabolismo ósseo, gastrointestinal, hepático e inflamação (YEGUTKIN, 2008). A secreção dessas moléculas para o meio extracelular pode ocorrer por exocitose através de grânulos de secreção, proteínas transportadoras ou canais de membrana (BURNSTOCK & BOEYNAEMS, 2014). Quando dano ou morte celular ocorrem, células necróticas e apoptóticas liberam ATP e outros nucleotídeos para o meio extracelular e essas moléculas funcionam como “sinais de perigo” ou “moléculas associadas ao dano”, DAMPs (do inglês *damage-associated molecular patterns*). Além disso, outros fatores de estresse celular como dano mecânico, hipóxia ou invasão por patógenos também podem desencadear a liberação extracelular de nucleotídeos (BURNSTOCK & BOEYNAEMS, 2014). Uma vez liberados para o meio extracelular os nucleotídeos são degradados por enzimas pertencentes a uma família de ectonucleotidases (ZIMMERMANN, 2001), produzindo uma série de nucleotídeos intermediários e nucleosídeos, que por sua vez também atuam como moléculas sinalizadoras.

I.2.2.1 Purinoceptores

Os receptores purinérgicos têm sido amplamente estudados em sistemas de sinalização em resposta ao ATP extracelular e nucleotídeos. Os receptores purinérgicos compreendem duas famílias e são classificados com base nas

propriedades estruturais e biológicas, consistindo a família P1 nos receptores seletivos para adenosina e a família P2 nos receptores seletivos para ATP, ADP, UTP e UDP (Figura 1). A família P2 é subdividida farmacologicamente em receptores P2X (ionotrópicos) e P2Y (metabotrópicos) (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

A classe P1 apresenta quatro subtipos de receptores para adenosina - A1, A2A, A2B e A3 – com distinto perfil farmacológico e distribuição tecidual específica. Todos esses subtipos são membros da superfamília de receptores acoplados às proteínas G. Classicamente, a sinalização mediada pelos receptores P1 ocorre através de estímulo ou inibição da adenilato ciclase com consequente formação de AMPc. Os receptores A1 e A3 inibem essa via, enquanto que os receptores A2A e A2B são capazes de ativá-la. Atualmente, atribuem-se também a outras vias de sinalização a função de modular a atividade dos receptores P1, especialmente as vias da fosfolipase C, de sinalização pelo Ca^{+2} e a via das MAP cinases (do inglês, *mitogen-activated protein kinases*) (JACOBSON & GAO, 2006). A classe de receptores P2X é composta de sete receptores ionotrópicos (P2X1-7) que são canais permeáveis para cátions (Na^{+} , K^{+} , Ca^{+2}), sendo o ATP o principal agonista. Esses receptores funcionam como homotrímeros, heterotrímeros ou multímeros, o que levará à diferenciação na distribuição tecidual, na permeabilidade a íons e na sensibilização a agonistas e antagonistas. Os receptores P2Y são subdivididos em oito subunidades e pertencem a superfamília de receptores acoplados a proteínas G, sendo os receptores (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11) acoplados à subunidade Gq das proteínas G e portanto são capazes de ativar a fosfolipase C enquanto que os receptores (P2Y12, P2Y13, P2Y14) são acoplados a proteína Gi e portanto, levam à inibição da adenilato ciclase. Esses receptores podem ser ativados por ATP, ADP, UTP, UDP e ITP e outros nucleotídeos (ABBRACCHIO et al., 2009).

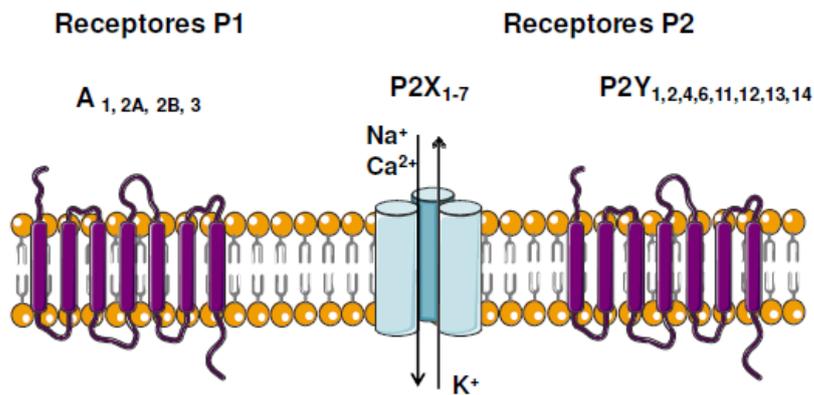


Figura 1. Representação da topografia dos receptores purinérgicos P1 e P2. Os receptores do tipo P1 são ativados pela adenosina, enquanto os receptores P2 por nucleotídeos, em especial o ATP.

I.2.2.2 O papel extracelular do ATP e da Adenosina

Os eventos bioquímicos na sinalização purinérgica, são iniciados pela liberação intracelular de ATP para o compartimento extracelular. As concentrações intracelulares desse nucleotídeo são extremamente elevadas, na faixa de 4 a 8 mM, o que justifica o fato de que muitas formas de dano celular levarão ao extravasamento dos *pools* intracelulares e essas concentrações aumentadas no meio extracelular sensibilizarão diferentes receptores. Estudos recentes têm atribuído a função de liberação dos nucleotídeos do meio intracelular aos canais de panexinas, principalmente durante o fenômeno de apoptose celular (IDZKO et al., 2014). Interessantemente, têm-se atribuído às panexinas o papel na cronicidade e agravamento de estados inflamatórios, através do controle da ativação de fagócitos (MAKARENKOVA & SHESTOPALOV, 2014). Uma vez liberado no meio extracelular, o ATP liga-se ao receptor P2X7, através do qual induz a produção de citocinas como IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-12, IL-18 e TNF- α por células imunes e o recrutamento de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos. Nos neutrófilos, as primeiras células imunes envolvidas em processos inflamatórios, o ATP estimula a degranulação, promove a adesão às células endoteliais, retarda a apoptose e induz a produção de espécies reativas de oxigênio (BOURS et al., 2006).

Através da ação sequencial de enzimas no meio extracelular, o ATP é metabolizado até adenosina, com consequente ativação de receptores específicos. A adenosina desencadeia efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores principalmente através da ação em receptores A2A. Em neutrófilos, por exemplo, a ativação desses receptores inibe a degranulação, modula a geração de ânions superóxido e inibe a expressão e liberação de várias quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Já em monócitos, leva à inibição da produção de TNF- α devido à ação da adenosina nos receptores P1 (BOURS et al., 2006; BURNSTOCK & BOEYNAEMS, 2014). Percebe-se, portanto, que o ATP e a adenosina exercem funções antagônicas no meio extracelular e que mecanismos de controle dessa cascata devem ser finamente regulados para que existam estímulos de proteção contra injúrias teciduais.

I.2.2.3 Guanosina

O papel dos nucleotídeos e nucleosídeo da guanina na sinalização celular classicamente estão relacionados com a regulação das cascatas intracelulares mediadas pelas proteínas G e consequente formação do segundo mensageiro GMPc (GMP cíclico). As proteínas G alternam-se entre a configuração ativa ligada ao GTP e a configuração inativa ligada ao GDP, sendo que a ativação dessa proteína é mediada via receptor e a inativação por uma atividade GTPase intrínseca dessas proteínas (SCHMIDT et al., 2007). Atualmente estudos têm demonstrado que os nucleotídeos e nucleosídeo da guanina também atuam no meio extracelular, onde regulam funções bioquímicas e celulares. Os principais mecanismos estudados até hoje envolvem as células do sistema nervoso central, onde a guanosina parece atuar na modulação do crescimento neuronal, na modulação da liberação de neurotransmissores nas sinapses, no comportamento e memória. Muito relevante é o papel neuroprotetor da guanosina frente a danos celulares causadas em modelos de hipóxia e isquemia (SCHMIDT et al., 2007).

Apesar das evidências que demonstram que a guanosina exibe um relevante efeito neuroprotetor em diferentes modelos de neurotoxicidade, o sítio

extracelular de ligação do nucleosídeo e a via de sinalização pela qual desencadeia efeitos intracelulares ainda não são totalmente compreendidos. Sugere-se que a guanosina possa modular os receptores de adenosina e assim desencadear os efeitos biológicos (CICCARELLI et al., 2000) ou que os efeitos sejam mediados por receptores próprios para guanosina, associados a proteínas G (TRAVERSA et al., 2003). Em um estudo de Jackson e colaboradores (2013) (JACKSON et al., 2013) em que diferentes tipos de células renais e cardíacas foram utilizados, a guanosina extracelular reduziu a remoção da adenosina, mantendo níveis aumentados desse nucleosídeo no meio extracelular e dessa maneira aumentou a capacidade de regulação da proliferação celular via receptores de adenosina. Os autores sugerem um mecanismo de regulação de níveis extracelulares de nucleosídeos em que a guanosina indiretamente atua aumentando os níveis extracelulares de adenosina que se liga aos seus receptores que atuam via proteínas G. Esse mecanismo poderia explicar como a guanosina extracelular modula diferentes sistemas biológicos já que em algumas células foram identificados receptores específicos para guanosina e em outras ainda não. Além disso, guanosina e GTP se ligam aos receptores de adenosina com uma afinidade muito baixa (MULLER & SCIOR, 1993) e os mecanismos pelos quais a guanosina desencadeia seus efeitos extracelulares segue sendo alvo de investigações. O mecanismo “guanosina-adenosina” parece ser uma via importante de sinalização em alguns tipos celulares e carece de maior elucidação.

I.2.2.4 Ectonucleotidases

Nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por uma variedade de enzimas que são localizadas na superfície das células ou que podem estar solúveis no meio intersticial ou em fluidos corpóreos. Os nucleotídeos tri e di fosfatados podem ser hidrolisados pelas enzimas membros das famílias das E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), E-NPP (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase) e pelas fosfatases alcalinas. Os nucleosídeos 5'-monofosfatados estão sujeitos à hidrólise através da ecto-5'-nucleotidase, assim

como das fosfatases alcalinas e presumivelmente, também por alguns membros da família das E-NPP (ZIMMERMANN, 2001). As ectonucleotidases apresentam características estruturais e bioquímicas que as identificam: (i) sítio catalítico dirigido para o meio extracelular ou para o lúmen de organelas, (ii) são ancoradas à membrana plasmática ou à membrana de algumas organelas, (iii) podem existir isoformas extracelulares clivadas ou solúveis, (iv) a máxima atividade catalítica depende da presença de cátions divalentes como cálcio e magnésio e (v) os valores de constante de Michaelis-Menten (K_m) dessas enzimas encontram-se na faixa micromolar (ZIMMERMANN, 2000). O término das cascatas sinalizadoras mediadas pelos nucleotídeos e a recuperação extracelular de purinas são importantes atividades funcionais destas enzimas (ZIMMERMANN, 2000).

1.2.2.4.1 Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (E-NTPDase, EC 3.6.1.5)

Os membros dessa família de enzimas possuem uma distribuição bastante ampla nos organismos e os genes codificadores para essas enzimas já são descritos não apenas para mamíferos, mas em invertebrados, plantas, leveduras, fungos e protozoários (VASCONCELOS et al., 1993; HANDA & GUIDOTTI, 1996; SMITH & KIRLEY, 1998; ZIMMERMANN, 1999). As E-NTPDases em mamíferos hidrolisam nucleosídeos tri e difosfatados, com consideráveis diferenças na preferência pelos substratos, porém todas as enzimas dessa família requerem íons Ca^{+2} e Mg^{+2} em faixas milimolares para atividade catalítica máxima, ficando inativas na ausência dessa condição (ROBSON et al., 2006b). Os membros individuais dessa família de enzimas podem diferir consideravelmente no que se refere à identidade de suas sequências. Porém, cinco domínios altamente conservados, as ACRs (do inglês, *apyrase conserved regions*) são compartilhados por todos os membros dessa família de enzimas e são considerados marcadores, além de desempenharem importante papel catalítico (HANDA & GUIDOTTI, 1996; ZIMMERMANN, 2001).

Oito genes codificadores para as enzimas membros da família E-NTPDases já foram clonados e caracterizados em mamíferos. Quatro NTPDases (1,2,3,8) são tipicamente localizadas na superfície da célula com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular; as NTPDases 5 e 6 exibem localização intracelular e são secretadas após clivagem proteolítica; já as NTPDases 4 e 7 são intracelulares voltadas para o lúmen do citoplasma de organelas como o complexo de Golgi (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006a). No que se refere às propriedades catalíticas, a NTPDase 1 (CD39) hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, enquanto que as NTPDases 3 (CD39L3) e NTPDase 8 revelam uma preferência por ATP em relação ao ADP (SMITH & KIRLEY, 1998). A NTPDase 2 (CD39L1) destaca-se pela sua alta preferência por nucleotídeos trifosfatados, chegando a hidrolisar 30 vezes mais ATP em relação ao ADP e por essa razão, já foi previamente classificada como uma ecto-ATPase (WANG & GUIDOTTI, 1996; KIRLEY, 1997; ZIMMERMANN, 1999). Já a NTPDase 4 (LALP70v) exibe maior hidrólise sobre UTP e UDP (WANG & GUIDOTTI, 1998), enquanto a NTPDase 7 (LALP1) prefere nucleotídeos trifosfatados (SHI et al., 2001). As NTPDases 5 (CD39L4) e 6 (CD39L2) são as enzimas mais recentemente caracterizadas e hidrolisam com maior preferência nucleotídeos difosfatados, em especial, UDP e GDP (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006a).

I.2.2.4.2 Ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5)

A ecto-5'-nucleotidase tem sido descrita em células bacterianas e vegetais e é vastamente distribuída nos tecidos de vertebrados (ZIMMERMANN, 1992). Em humanos, quatro enzimas 5'-nucleotidases já foram isoladas e caracterizadas, sendo cinco delas localizadas no citosol, uma na matriz mitocondrial e uma voltada para o lado externo da membrana plasmática. A ecto-5'-nucleotidase (CD73), que representa um marcador de maturação de linfócitos T e B humanos (AIRAS et al., 1995), consiste de duas subunidades de glicoproteínas com uma massa molecular aparente de 60-70 kDa, que estão unidas através de ligações não-covalentes (ZIMMERMANN, 2001). Essa enzima liga zinco e outros íons

metálicos divalentes ao domínio N-terminal e é ancorada à membrana plasmática através da porção C-terminal por uma ligação glicosil-fosfatidilinositol (ZIMMERMANN, 1992; YEGUTKIN, 2008). Essa enzima é expressa em uma ampla variedade de tecidos, como cólon, rins, cérebro, coração e pulmões e também em bactérias, plantas e protozoários. A ecto-5'-nucleotidase desempenha um papel essencial na formação da adenosina a partir da hidrólise do AMP e outros nucleosídeos monofosfatados e subsequente ativação de receptores P1 e, além disso, parece estar envolvida nos processos de adesão celular (ZIMMERMANN, 1992; ZIMMERMANN, 2001).

I.2.2.4.3 Adenosina Deaminase

A adenosina deaminase (ADA) é outra importante enzima na cascata de inativação de purinas, sendo responsável pela deaminação irreversível da adenosina e da 2-deoxi-adenosina à inosina e 2-deoxi-inosina, respectivamente (YEGUTKIN, 2008). A ADA é amplamente expressa no intestino, no timo, no baço e em outros tecidos linfoides e não linfoides (MORIWAKI et al., 1999; SPYCHALA, 2000). Além de sua localização citosólica, a ADA também pode ser expressa como uma ectoenzima (ectoADA) na membrana plasmática de diversas células imunes, como os linfócitos e as células dendríticas, sendo ancorada à glicoproteína de membrana CD26 ou ancorada à receptores A₁ de adenosina e ainda uma forma denominada ADA2, que pode ser secretada e representa a maior atividade de ADA no soro humano (FRANCO et al., 1997; YEGUTKIN, 2008). A deficiência de ADA em humanos é responsável por aproximadamente 20% dos casos de imunodeficiência severa combinada e afeta drasticamente a função das células envolvidas na imunidade celular (linfócitos T) e humoral (linfócitos B) (BLACKBURN & KELLEMS, 2005). Além de células de mamíferos, a ADA tem sido descrita também em insetos hematófagos, moluscos e parasitos, como *Plasmodium lophura* e *Trichinella spiralis* (GOUNARIS & SELKIRK, 2005).

I.2.2.5 Sinalização Purinérgica em Protozoários

Os organismos hospedeiros e suas células desenvolveram uma ampla variedade de mecanismos para controlar infecções e simultaneamente, os patógenos adaptaram vias de contornar os mecanismos de defesa do hospedeiro. Assim, os patógenos podem subverter citocinas e quimiocinas antimicrobianas liberadas no sítio da infecção, alterar vias de sinalização intracelulares, interferir nos componentes de membrana da célula hospedeira e modificar bioquimicamente seu metabolismo (COUTINHO-SILVA et al., 2009). Nesse contexto, a modulação da interação parasito-hospedeiro mediada pelo sistema purinérgico têm sido alvo de investigação. A ativação do receptor purinérgico, P2X7, tem sido estudada como uma importante resposta frente às infecções microbianas. A ligação do ATP ao receptor pode estimular a secreção e ativação de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de células do sistema imune, mas também pode levar diretamente à morte de patógenos intracelulares em macrófagos infectados e células epiteliais, por exemplo (COUTINHO-SILVA et al., 2009).

Além da modulação do sistema imune na célula hospedeira, o sistema purinérgico desempenha funções importantes para os patógenos no contexto da manutenção da infecção. A capacidade de evadir os mecanismos de defesa do hospedeiro pode ser atribuída à utilização das enzimas que hidrolisam nucleotídeos como o ATP e ADP. Além disso, a hidrólise adicional de AMP à adenosina pelas enzimas parasitárias desempenha um papel importante na limitação da resposta inflamatória e, além disso, alguns patógenos podem utilizar o nucleosídeo para suprir as demandas de purinas para seu crescimento (SANSOM et al., 2008b).

As enzimas E-NTPDase, ecto-5'-nucleotidase e ADA já foram descritas e caracterizadas em uma variedade de parasitos, entre eles: *Toxoplasma gondii* (ASAI et al., 1995), *Tritrichomonas foetus* (JESUS et al., 2002), tripanossomatídeos (FIETTO et al., 2004; FONSECA et al., 2006; DE SOUZA LEITE et al., 2007), *Schistosoma mansoni* (FARIA-PINTO et al., 2004) e *Trichomonas vaginalis* (MATOS et al., 2001; TASCA et al., 2003;

WEIZENMANN et al., 2011). Considerando as NTPDases, estudos estruturais que revelam a presença das cinco ACRs, em paralelo às análises bioquímicas que avaliam preferência e especificidade por substratos e análises moleculares de expressão gênica e proteica, têm sido conduzidos na tentativa de esclarecer a função das enzimas na virulência e na relação parasito-hospedeiro (SANSOM et al., 2008a). É cada vez mais evidente que essas enzimas podem ser alvos terapêuticos importantes, uma vez que desempenham papel essencial no balanço entre resposta inflamatória e limitação de resposta imune. Ainda mais significativa é a participação das enzimas na via de salvação de purinas, que, na maioria dos protozoários é a rota exclusiva para captação de nucleosídeos extracelulares para manutenção da sobrevivência.

Além da hidrólise de nucleotídeos da adenina pelas NTPDases, já foi demonstrado que muitos parasitos são capazes de hidrolisar nucleotídeos de outras bases. Em *Legionella pneumophila*, por exemplo, as NTPDases hidrolisam bases de purina e pirimidina, tais como GTP, UTP e CTP com eficiências semelhantes àsquelas para ATP e ADP (SANSOM et al., 2008c). Em parasitos, NTPDases que hidrolisam eficientemente nucleotídeos que não da adenina incluem aquelas encontradas em *T. gondii* (ASAI et al., 1995), *Tritrichomonas foetus* (JESUS et al., 2002), tripanossomatídeos (FONSECA et al., 2006; DE SOUZA LEITE et al., 2007) e *Schistosoma mansoni* (FARIA-PINTO et al., 2004). Nucleotídeos que não da adenina como UTP e UDP são agonistas de receptores P2Y e em alguns casos apresentam maior afinidade por esses receptores do que o próprio ATP (BURNSTOCK, 2007a). Além disso, já foi demonstrado que o UTP é capaz de estimular a expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, tendo papel importante na resposta imune (KOBAYASHI et al., 2006).

I.2.2.5.1 Sinalização Purinérgica em *T. vaginalis*

A participação da cascata enzimática na fisiologia de *T. vaginalis* é crucial não apenas para a regulação dos níveis extracelulares do balanço entre

nucleotídeos e nucleosídeos que regulam os processos bioquímicos e inflamatórios no sítio da infecção, mas especialmente na geração dos nucleosídeos que serão incorporados nas vias de salvação. Quanto ao metabolismo dos nucleotídeos, *T. vaginalis* é auxotrófico de purinas e pirimidinas sendo absolutamente dependente das vias salvação de purinas para a manutenção do *pool* intracelular de nucleosídeos e consequente incorporação ao DNA do parasito. 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: purina nucleosídeo fosforilase (PNP, do inglês *Purine Nucleoside Phosphorylase*), a qual catalisa a interconversão entre bases púricas e nucleosídeos, e 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 sustentar o crescimento *in vitro* dos parasitos (MUNAGALA & WANG, 2003). 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 recaptação 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). Esse estudo demonstrou que a adenosina é

transportada a uma taxa mais rápida do que a guanosina, porém substancialmente mais rápida do que a uridina. O mesmo estudo demonstrou que após 100 segundos, aproximadamente 75% da adenosina é recuperada na forma de nucleotídeo intracelular, majoritariamente como ATP e ADP (HARRIS et al., 1988).

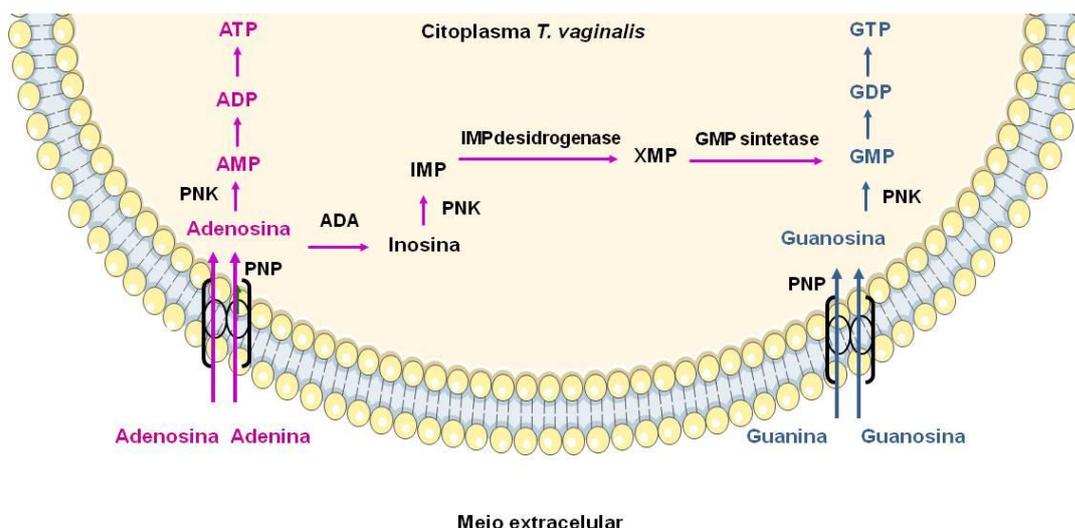


Figura 2. Esquema das vias de salvação de purinas em *T. vaginalis*. PNP: purina nucleosídeo fosforilase, PNK: purina nucleosídeo cinase, ADA: adenosina deaminase. Adaptado de Munagala e Wang, 2003.

Com o recente conhecimento do genoma completo do *T. vaginalis*, os estudos em relação a sequências hipotéticas de enzimas do metabolismo do parasito e suas propriedades bioquímicas tiveram uma grande evolução. Em recente estudo de Frasson e colaboradores (2016) a expressão gênica de cinco sequências hipotéticas de NTPDases (*TvNTPDases1-5*) foram expressas em isolados clínicos frescos e em isolado ATCC de *T. vaginalis* (FRASSON et al., 2016). As análises de sequenciamento e alinhamento de aminoácidos revelaram a presença de cinco ACRs, domínios transmembranas, regiões de peptídeo sinal e sítios catalíticos e de fosforilação. Esses dados corroboram os dados de caracterização de atividade enzimática de NTPDase de *T. vaginalis* caracterizada em trofozoítos lisados (MATOS et al., 2001). Em relação à localização

enzimática, um estudo de citoquímica revelou a presença de grânulos de fosfato de chumbo na superfície da membrana plasmática dos trofozoítos, sugerindo ectolocalização da NTPDase (TASCA et al., 2004).

Em trofozoítos intactos de *T. vaginalis*, também já foi descrita uma atividade de ecto-5'-nucleotidase na superfície das células, com hidrólise preferencial por AMP e GMP, mas ainda apresentando especificidade por CMP e UMP (TASCA et al., 2003). A enzima adenosina deaminase, importante na finalização da cascata de hidrólise de nucleotídeos, também já foi caracterizada em trofozoítos intactos de *T. vaginalis*. Demonstrou-se que a enzima degrada eficientemente adenosina e 2'-deoxiadenosina, embora não apresente atividade sobre guanosina e 2-deoxiguanosina (WEIZENMANN et al., 2011). Interessantemente, o estudo demonstrou ainda que, após inibição da ecto-5'-nucleotidase a atividade da ADA foi completamente abolida, demonstrando uma importante associação entre as enzimas no que concerne a regulação da hidrólise de nucleotídeos e nucleosídeos (WEIZENMANN et al., 2011).

Diversos estudos já demonstraram o possível papel dessas enzimas na modulação da patogenicidade do *T. vaginalis* durante o estabelecimento do parasitismo. A D-galactose, molécula que atua no processo de adesão do parasito à célula hospedeira, foi responsável pelo aumento da atividade da NTPDase em 90%, sugerindo um papel dessa enzima na modulação do processo de adesão, porém mais evidências são necessárias para elucidar os mecanismos bioquímicos envolvidos no processo (DE JESUS et al., 2002). Também já foi demonstrado que isolados frescos de *T. vaginalis* apresentam maior atividade de NTPDase quando comparados ao isolados em longo cultivo, sugerindo também um possível papel na modulação da virulência do parasito (DE JESUS et al., 2002). Em relação à tricomoníase, há relatos na literatura que demonstram que os sintomas da infecção são exacerbados no período menstrual em que as taxas de hormônios seriam responsáveis por provocarem um aumento da adesão dos parasitos. Nesse contexto, já foi demonstrado que os hormônios sexuais são capazes de regular a atividade das enzimas, promovendo alterações nos níveis de

ATP e ADP extracelular, influenciando os níveis de adesão, podendo assim modular a colonização por *T. vaginalis* (RÜCKERT et al., 2010).

In vitro, o cultivo de *T. vaginalis* é tradicionalmente suplementado com soro bovino, como uma fonte importante de purinas e pirimidinas para o crescimento dos trofozoítos. Alguns estudos já demonstraram o efeito da privação de soro no crescimento e metabolismo de alguns tipos celulares. Um estudo de Rapaport e Zamecnik (1978) demonstrou que em linhagens celulares de mamíferos, a privação de soro levou à alteração do crescimento celular e promoveu um aumento na incorporação de adenosina em nucleotídeos da adenina (RAPAPORT & ZAMECNIK, 1978). Em diferentes parasitos, a privação de purinas e pirimidinas ocasionada pela restrição de soro parece aumentar a atividade das ectonucleotidases e a taxa de transporte de nucleosídeos extracelulares pelos transportadores (GERO, 1998; DE KONING et al., 2000; CARTER & WHITHAUS, 2008). Um estudo recente do nosso grupo demonstrou que a privação de soro alterou o perfil de hidrólise das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, além de aumentar significativamente os níveis de expressão da NTPDase e influenciar a taxa de crescimento dos trofozoítos (FRASSON et al., 2012b). Esse estudo reforça a hipótese de que a cascata enzimática em *T. vaginalis* é essencial para prover os nucleotídeos e nucleosídeos necessários para a incorporação ao pool intracelular e em consequência atender as demandas metabólicas e energéticas do parasito necessárias para o estabelecimento da infecção.

Em *T. vaginalis* essas enzimas parecem ainda ter papel importante na modulação de aspectos da resposta imune desencadeada no sítio da infecção. Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que a adenosina e a inosina promoveram uma redução da concentração de óxido nítrico produzido por neutrófilos estimulados por trofozoítos. O efeito imunossupressor da adenosina foi desencadeado pela ativação de receptores do tipo A2A. Conclui-se que a atividade da ecto-5'-nucleotidase é crucial nesse processo uma vez que é responsável pelo suprimento de adenosina no processo, indicando a eficiência da cascata

enzimática na regulação desse aspecto da resposta imune (FRASSON et al., 2012a).

Para maiores considerações acerca dos aspectos imunes envolvidos na infecção e a participação do sistema purinérgico na modulação desse processo, consultar artigo científico para publicação, conforme referência abaixo, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 161-176.

“Trichomoniasis immunity and the involvement of the purinergic signaling”.
(Menezes & Tasca, no prelo).

I.2.2.6 As ectonucleotidasas como alvos terapêuticos

Inibidores potentes e seletivos para as isoenzimas da NTPDase são ferramentas farmacológicas essenciais na investigação do envolvimento dessas enzimas em eventos fisiológicos, bioquímicos e imunológicos. Nesse contexto, tais compostos tornam-se alvo de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial imunomodulador, imunossupressor e para o tratamento de doenças cérebro-cardiovasculares, por exemplo. Apesar dos esforços na busca dos inibidores dessas enzimas, poucas classes de inibidores das NTPDases estão descritos, dentre eles análogos e derivados de nucleotídeos, especialmente do ATP (BAQI et al., 2009). Até o momento, o único composto descrito que é capaz de inibir a hidrólise de ATP em uma variedade ampla de tecidos (ainda que com potência moderada) sem atuar significativamente nos receptores P2 é o análogo estrutural do ATP, ARL 67156 (BAQI et al., 2009). Alguns inibidores não análogos de nucleotídeos também já foram descritos por atenuarem a hidrólise de ATP, como suramin e PPADS (piridoxilfosfato-6-azofenil-2', 4'- ácido dissulfônico), porém são compostos não seletivos e com potencial de antagonizar os receptores do tipo P2. Nesse sentido, é crescente o interesse na investigação de compostos naturais, semissintéticos e sintéticos que possam atuar seletivamente

na inibição dessas enzimas e conseqüentemente modularem os diferentes efeitos biológicos desencadeados pela hidrólise extracelular de nucleotídeos.

Alguns estudos já demonstraram o potencial de extratos de plantas, bem como de compostos naturais na modulação da hidrólise enzimática de nucleotídeos pelas enzimas da cascata de sinalização purinérgica. Em um estudo conduzido com derivados de antraquinonas demonstrou-se um alto grau de inibição e seletividade frente às enzimas NTPDase 1 e 3 (BAQI et al., 2009). A ativação do receptor P2X7 pelo ATP através da ativação e sensibilização dos canais de Ca^{+2} foi modulada por diferentes compostos naturais em uma linhagem celular de melanoma (FISCHER et al., 2014). Estudos conduzidos em diferentes modelos animais também já demonstraram o potencial de inibição ou ativação dessas enzimas com possíveis implicações para o tratamento de diferentes patologias (GORGEN et al., 2005; DA SILVA et al., 2006; CASTILHOS et al., 2015). O efeito de extratos de plantas na ativação dos receptores P2X e P2Y e conseqüentemente na modulação da agregação plaquetária também tem sido vastamente estudado. Já foi demonstrado que diferentes extratos de plantas são capazes de inibir a agregação plaquetária mediada pelo ADP em humanos, sendo considerados possíveis alternativas terapêuticas em diferentes patologias e distúrbios de coagulação (JAGROOP, 2014). Embora bastante preliminares, os estudos já apontam para o crescente interesse na área de desenvolvimento de fármacos com potencial modulação da cascata enzimática mediada pelas NTPDases e pelos receptores purinérgicos.

Em *T. vaginalis*, a modulação dessa cascata enzimática além de ter função relevante na regulação dos mecanismos de patogenicidade do parasito durante o curso da infecção, pode ter papel crucial na terapêutica utilizada no tratamento da tricomoníase. Um estudo de Giordani e colaboradores (2011) demonstrou que os alcaloides licorina e candimina inibiram fortemente as atividades da NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase quando trofozoítos intactos foram tratados por 24 horas, demonstrando que os níveis de ATP e adenosina extracelulares podem ser modulados pelos alcaloides testados (GIORDANI et al., 2010). Considerando-se

os papéis citotóxicos e pró-inflamatórios do ATP além dos efeitos anti-inflamatórios da adenosina, a regulação dos níveis de nucleotídeos extracelulares poderia ser relevante no aumento da suscetibilidade do *T. vaginalis* à resposta imune do hospedeiro na presença desses alcaloides. Dessa maneira, a modulação dessa via enzimática por compostos ativos frente ao *T. vaginalis* poderia ser um mecanismo adjuvante ao tratamento tradicional da tricomoníase, hoje restrito a uma única classe de fármacos que apresenta importantes limitações.

I.3 Derivados de floroglucinol

Plantas pertencentes à família Clusiaceae são amplamente difundidas na medicina popular, apresentando como principais usos anti-inflamatório, antimicrobiano e anti-hemorragico. Destaca-se nessa família, o gênero *Hypericum* que tem utilização difundida em diversas partes do mundo e compostos com atividades antiviral, antifúngica, antibiótica e anticâncer têm sido isolados, estudados e caracterizados (ISHIGURO et al., 1987; HU et al., 2000). No que se refere ao gênero *Hypericum*, mais de 400 espécies desse gênero já foram catalogadas, sendo que *H. perforatum* L., indicada para tratamento de feridas, eczemas e distúrbios psicológicos é a mais amplamente estudada. Os extratos oriundos dessa espécie são os produtos de origem vegetal que apresentam o maior número de estudos clínicos no mundo, apresentando-se como alternativa aos antidepressivos sintéticos atuais empregados na prática clínica.

A intensa pesquisa em espécies de *Hypericum*, motivada principalmente pelos compostos de *H. perforatum* L., tem levado à descoberta de diferentes compostos do gênero com atividades biológicas bastante promissoras, dentre esses se destacam os flavonoides, xantonas e derivados de floroglucinol. Os floroglucinois têm despertado interesse visto que atividades biológicas importantes já foram descritas em tais moléculas, como anti-herpética, anti-helmíntica, antibacteriana e antiproliferativa (ROCHA et al., 1995; ROCHA et

al., 1996; FERRAZ et al., 2005). Recentemente, também foi descrita atividade antinociceptiva dos derivados de floroglucinol uligisonina B, austrobrasilol A, austrobrasilol B e isoaustróbrasilol B (STOLZ et al., 2014; BRIDI et al., 2016). Interessantemente, em relação ao efeito antinociceptivo de uligisonina B, Stolz e colaboradores (2016) demonstraram que o efeito observado ocorre via ativação de receptores A1 e A2A de adenosina e que a modulação da atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase contribui para o efeito antinociceptivo do composto (STOLZ et al., 2016). A atividade antiparasitária dos derivados de floroglucinol, especificamente da uliginosina B já foi descrita em *T. vaginalis* (CARGNIN et al., 2013) e extratos de diferentes espécies de *Hypericum* enriquecidas com floroglucinois já demonstraram promissora atividade anti-*Leishmania amazonensis* (DAGNINO et al., 2015).

Considerando o interesse na busca de produtos naturais com atividades biológicas e as enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase como possíveis alvos terapêuticos em *T. vaginalis*, torna-se relevante o estudo de avaliação de atividade biológica dos floroglucinois frente ao *T. vaginalis*. A investigação da atividade moduladora desses compostos na hidrólise extracelular de nucleotídeos no parasito, poderia influenciar os níveis desses compostos sinalizadores no sítio da infecção.



I.3 Objetivos

Considerando (i) o impacto da tricomoníase na saúde pública, (ii) o papel da sinalização purinérgica nos processos inflamatórios e na modulação da interação parasito-hospedeiro, (iii) a presença de ectonucleotidases já caracterizadas em *T. vaginalis*, (iv) a necessidade de caracterização da atividade dessas enzimas frente aos nucleotídeos da guanina (v) a busca por uma melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro e (vi) a investigação de novos alvos terapêuticos para o tratamento da tricomoníase, o objetivo geral deste estudo é investigar o papel dos nucleotídeos e nucleosídeo da guanina na sinalização celular envolvida na patogênese da tricomoníase.

Os objetivos específicos propostos foram:

1. Avaliar as atividades enzimáticas da NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase, considerando como substratos nucleotídeos da guanina (GTP, GDP, GMP) em isolados de *T. vaginalis* clínicos frescos e de longo tempo de cultivo e determinar parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) para as enzimas;
2. Avaliar o metabolismo do GTP pelas enzimas, a expressão gênica das NTPDases e o perfil de recaptção de guanosina e adenosina extracelular em uma situação de privação de soro bovino adulto;
3. Avaliar o envolvimento da sinalização mediada pela guanosina e adenosina na citotoxicidade de trofozoítos frente às células epiteliais vaginais (CEVs) e células epiteliais prostáticas (CEPs);
4. Investigar a atividade anti-*T.vaginalis* e potencial de inibição das ectonucleotidases por compostos da classe dos fluoroglucinois.

PARTE II



II Artigos Científicos

Capítulo II.1: O presente Capítulo é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 74-82.

Camila Braz Menezes, Juliano Durgante, Rafael Rodrigues de Oliveira, Victor Hugo Jacks M dos Santos, Frederico Rodrigues, Solange Cristina Garcia, Odelta dos Santos, Tiana Tasca. ***Trichomonas vaginalis* NTPDase and ecto-5'-nucleotidase hydrolyze guanine nucleotides and increase extracellular guanosine levels under serum restriction.** Molecular and Biochemical Parasitology. 2016 May; 207(1):10-8. doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.04.003

RESUMO DOS RESULTADOS:

Através desse capítulo foi possível demonstrar que os nucleótidos de guanina (GTP, GDP, GMP) são substratos para as ectonucleotidasess de *T. vaginalis*, apresentando parâmetros cinéticos como esperado para esta família de enzimas. Os diferentes isolados (isolados de longo cultivo e isolados clínicos frescos) apresentaram perfis heterogêneos de hidrólise A condição metabólica de restrição de soro bovino adulto aumentou a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase. Os dados do metabolismo dos nucleotídeos revelaram um aumento da hidrólise de GTP e formação de nucleotídeos intermediários (GDP e GMP) na condição de estrição metabólica quando comparado à condição controle. O produto final da cascata, o nucleosídeo guanosina foi formado em maiores concentrações na situação de restrição de soro e houve acúmulo extracelular desse composto. Os níveis de transcrição das cinco sequências de TvNTPDases foram analisadas e as expressões dos genes mais elevados foram encontrados para TvNTPDase 2 e 4. A recaptção guanosina e adenosina extracelular foi observada através de nucleotídeos com marcação isotópica detectados no DNA dos parasitos. Houve menor recaptção de guanosina na forma de ¹³C-GTP em relação à adenosina, detectada na forma de ¹³C-ATP. Estes resultados

indicam a preferência de *T. vaginalis* pela receptação de adenosina em uma situação de restrição metabólica e de acúmulo de guanósina no meio extracelular, corroborando com dados obtidos nos experimentos enzimáticos e sugerindo um possível papel biológico para o acúmulo extracelular de guanósina no contexto da infecção.

CAPÍTULO II. 2: Camila Braz Menezes, Tiana Tasca. **Adenosine, but not guanosine, protects vaginal epithelial cells from *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity.**

As páginas 83-98 da versão completa desta tese foram suprimidas uma vez que correspondem ao manuscrito a ser submetido ao periódico *Microbes and Infection*.

RESUMO DOS RESULTADOS:

Nossos resultados demonstraram que em alguma proporção, todos os isolados utilizados no estudo (isolados de longo cultivo e isolados clínicos frescos) levaram a um efeito citolítico frente às células epiteliais vaginais humanas. O isolado mais citotóxico, TV-LACM6 demonstrou atividade de hidrólise dos nucleotídeos ATP, GTP, AMP e GMP, o que reforça a presença de atividade de NTPDase e ecto-5'-nucleotidase nesse isolado. Observou-se maior eficiência na hidrólise de GMP em comparação à AMP. Quando nucleotídeos e nucleosídeos foram testados, o efeito citotóxico mediado pelo isolado TV-LACM6 foi potencializado na presença dos nucleotídeos ATP and GTP. Por outro lado, o perfil de citotoxicidade foi revertido pelo acúmulo de adenosina, obtido na condição de co-incubação com EHNA. O efeito de reversão de citotoxicidade não foi observado na presença de guanosina. A fim de se avaliar o provável mecanismo envolvido nos efeitos mediados pela adenosina, foi realizada uma co-incubação com cafeína, antagonista inespecífico de receptores do tipo P1 de adenosina. Houve reversão do efeito citoprotetor mediado pelo acúmulo de adenosina. Em relação ao envolvimento de receptores envolvidos, observou-se que os receptores ADORA1 and ADORA2A não estão envolvidos. De maneira geral, o capítulo demonstrou que a produção de guanosina e adenosina parece modular a citotoxicidade mediada pelo *T. vaginalis* frente às células hospedeiras, processo chave para o processo de colonização e estabelecimento da infecção.

CAPÍTULO II. 3: Camila Braz Menezes, Graziela de Vargas Rigo, Henrique Bridi, Danielle da Silva Trentin, Alexandre José Macedo, Gilsane Lino Von Poser, Tiana Tasca. **Modulation of extracellular nucleotides hydrolysis as an additional mechanism for anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the phloroglucinol derivative isoastrobrasilol B**

As páginas 99-124 da versão completa desta tese foram suprimidas uma vez que correspondem ao manuscrito a ser submetido ao periódico *Parasitology*.

RESUMO DOS RESULTADOS:

O objetivo do estudo foi investigar a atividade de onze derivados de floroglucinois isolados de espécies de *Hypericum* do sul do Brasil e do Peru frente à *T. vaginalis*, bem como a capacidade dos compostos ativos em modular as enzimas ectonucleotidases do parasito e consequentemente, respostas imunes. Os resultados do screening de atividade demonstraram que os compostos mais ativos foram os derivados isoastrobrasilol B, isohiperbrasilol B e isouliginosina B (IC₅₀ 48 µM), com valores de IC₅₀ 38, 73 e 48 µM, respectivamente. Os compostos não demonstraram atividade hemolítica frente a eritrócitos humanos quando comparado ao veículo ou ao controle. Embora o composto mais ativo (isoastrobrasilol B) tenha apresentado citotoxicidade frente à célula epitelial vaginal humana (índice de seletividade <10), o modelo *in vivo* revelou ausência de toxicidade, uma vez que o tratamento com o composto não alterou a taxa de sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella*. O resultado reforça a necessidade de utilização de modelos de toxicidade adequados para a avaliação de compostos ativos promissores. O derivado isoastrobrasilol B foi o único composto que inibiu significativamente a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, levando ao acúmulo extracelular de nucleotídeos. A modulação imune mediada pelo acúmulo extracelular desses compostos foi avaliada. A produção

de espécies reativas de oxigênio e interleucina-6 (IL-6) por neutrófilos estimulados por *T.vaginalis* não foi afetada pelo tratamento com o composto. Por outro lado, a liberação de interleucina-8 (IL-8), a principal interleucina produzida por neutrófilos na tricomoníase, foi aumentada. O efeito sinérgico de redução de viabilidade de trofozoítos e modulação da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase pode aumentar a suscetibilidade do *T. vaginalis* frente à resposta imune do hospedeiro e consequentemente, sua eliminação do sítio de infecção.

PARTE III

III.1. Discussão Geral

A tricomoníase, doença sexualmente transmissível (DST), causada pelo protozoário flagelado *Trichomonas vaginalis* apresenta uma incidência de 276 milhões de novos casos ao ano, números bastante expressivos e que ultrapassam as incidências combinadas das infecções por *Chlamydia*, gonorreia e sífilis (WHO, 2012). A infecção na maioria dos países, incluindo países desenvolvidos como os Estados Unidos, não é de notificação obrigatória aos sistemas de vigilância em saúde, o que determina que os números de prevalência e incidência possam ser subestimados. Apesar da alta incidência e dos esforços em pesquisa, o desenvolvimento de fármacos e controle da infecção causada pelo protozoário seguem escassos em comparação com outras DSTs. A infecção afeta desproporcionalmente as minorias e as populações de baixa renda de países em desenvolvimento, o que contribui para sua classificação como uma doença parasitária negligenciada (SECOR et al., 2014).

Dados nos Estados Unidos apontam que os custos médicos associados à terapêutica da tricomoníase alcançam 24 milhões de dólares ao ano (OWUSU-EDUSEI et al., 2013), desconsiderando-se possíveis complicações e efeitos adversos associados ao tratamento. Os custos podem se tornar ainda mais alarmantes atingindo 167 milhões de dólares ao ano quando são consideradas as complicações atribuídas à facilitação da aquisição e transmissão do vírus HIV pelo *T. vaginalis*. Deve-se ressaltar ainda que esses valores podem ser majorados, quando as demais complicações associadas à infecção, como desenvolvimento de câncer cervical e de próstata, são levadas em consideração.

O tratamento da tricomoníase é restrito aos fármacos da classe dos 5-nitroimidazóis, com o metronidazol e o tinidazol sendo os únicos representantes do grupo aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*, USA). Estudos *in vitro* demonstram que o tinidazol apresenta maior eficácia contra isolados de *T. vaginalis* do que o metronidazol, além de induzir efeitos adversos em menores proporções. Entretanto, devido à similaridade estrutural entre os dois compostos, infecções que se mostram resistentes ao metronidazol apresentam alta

probabilidade de não serem curadas com doses padrões de tinidazol. Considerando-se que os estudos apontam que casos de resistência ao metronidazol atinjam até 9,6% das infecções (SCHWEBKE & BARRIENTES, 2006) e ainda as altas taxas de incidência da infecção, a problemática da resistência torna-se problema de saúde pública reforçando a necessidade iminente de busca por novos alvos terapêuticos com estrutura química e mecanismos de ação diversos daqueles observados para a classe dos 5-nitroimidazóis.

O avanço da elucidação de aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares de patógenos permite o desenvolvimento de inovações terapêuticas e pode ser uma abordagem racional na busca por novos alvos terapêuticos. O desenvolvimento da pesquisa de compostos antiparasitários baseia-se principalmente na investigação de rotas bioquímicas do parasito e quando passíveis de modulação, a comparação de similaridades entre essas vias com as do hospedeiro, objetivando a identificação de possíveis alvos para a seletiva modulação através de novos compostos (VERLINDE et al., 2001).

Nesse contexto, o sistema purinérgico apresenta-se como uma via de investigação de novos alvos antiparasitários, visto que participa da modulação de cascatas de sinalização extracelulares que envolvem nucleotídeos, nucleosídeos, enzimas e receptores de células (BURNSTOCK, 2007b). As enzimas pertencentes à família das ectonucleotidases (ZIMMERMANN, 2001) regulam o balanço extracelular de nucleotídeos/nucleosídeos e já foram caracterizadas em diversos parasitos (SANSOM et al., 2008a), incluindo *T. vaginalis* (MATOS et al., 2001; TASCA et al., 2003). As enzimas são alvos biológicos extremamente importantes para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, visto que desempenham papel essencial na geração de compostos chave para a sobrevivência dos patógenos em distintas rotas metabólicas. Além disso, são alvos de fácil adaptação em ensaios biológicos, passíveis de purificação e versáteis na aplicação de ferramentas como a bioinformática (MESTRES, 2005).

Em *T. vaginalis* as ectonucleotidases apresentam papel crucial na sobrevivência dos trofozoítos, visto que *T. vaginalis* não é capaz de sintetizar purinas pela via *de novo*, a hidrólise sequencial de nucleotídeos promovida por essas enzimas fornece os nucleosídeos que serão recaptados e incorporados ao *pool* intracelular para a síntese de nucleotídeos (HEYWORTH et al., 1982). Além desse papel crucial na incorporação de purinas, as enzimas podem participar da modulação de resposta imune do hospedeiro frente à infecção, visto que a hidrólise sequencial do ATP, que apresenta propriedades pró-inflamatórias, até adenosina, a qual é capaz de contrabalancear inúmeros efeitos promovidos pelo ATP devido ao seu efeito imunossupressor em diferentes células imunes (BURNSTOCK & BOEYNAEMS, 2014). Nesse contexto, Frasson e colaboradores (2012) demonstraram que os níveis de óxido nítrico, metabólito produzido por neutrófilos, a principal célula imune recrutada para o sítio da infecção pelo *T. vaginalis*, podem ser modulados pela adenosina, produto final dessa cascata enzimática (FRASSON et al., 2012a).

A guanosina é um nucleosídeo classicamente estudado devido à modulação de vias de sinalização intracelular mediadas pelo GMPc, que atua como um segundo mensageiro, mais notavelmente por ativar as proteínas cinases intracelulares em resposta à ligação de diferentes moléculas e peptídeos sinais na superfície da membrana das células. Além dos efeitos intracelulares da guanosina, o nucleosídeo também apresenta atividades no meio extracelular, onde regula funções bioquímicas e celulares. Os principais mecanismos estudados até hoje envolvem as células do sistema nervoso central, onde a guanosina parece atuar na modulação do crescimento neuronal, na modulação da liberação de neurotransmissores nas sinapses, no comportamento e memória, e mais relevante ainda, é o papel neuroprotetor do nucleosídeo frente a danos celulares causadas em modelos de hipóxia e isquemia (SCHMIDT et al., 2000; SCHMIDT et al., 2007). Em parasitos, a literatura acerca do possível envolvimento do nucleosídeo nos mecanismos de infecção, patogênese e regulação de respostas imunes do hospedeiro é escassa. Em diferentes parasitos

já foi demonstrado que os nucleotídeos da guanina GTP, GDP e GMP são substratos para as ectonucleotidasas em diferentes proporções e com diferenças preferenciais nas taxas de hidrólise (SANSOM et al., 2008b). Em *T. vaginalis* o perfil de hidrólise de nucleotídeos da guanina, a regulação dessas enzimas em condições metabólicas específicas e o papel do balanço extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos na modulação de mecanismos de patogenicidade é desconhecido.

No sentido de investigar as lacunas desse campo de estudo, o objetivo do Capítulo I foi investigar o perfil de hidrólise dos nucleotídeos da guanina pelas ectonucleotidasas de *T. vaginalis*. Partiu-se da caracterização dos parâmetros cinéticos atribuídos às enzimas frente aos substratos derivados da guanina e demonstrou-se em diferentes isolados clínicos frescos e em isolados de longo cultivo que os nucleotídeos da guanina são substratos para as ectonucleotidasas de *T. vaginalis*. O perfil de hidrólise foi bastante heterogêneo e de maneira geral, os nucleotídeos tri e di fosfatados apresentaram maior taxa de hidrólise em comparação com o nucleotídeo monofosfatado. Considerando-se que *T. vaginalis* é um protozoário auxotrófico para purinas e dependente de fontes exógenas de nucleosídeos, que são incorporados por uma via única de salvação de purinas constituída pelas enzimas PNP and PNK, a hidrólise extracelular de nucleosídeos mediada pelas ectonucleotidasas sustentam as demandas de purinas necessárias ao metabolismo do parasito.

A partir da demonstração da hidrólise dos nucleotídeos da guanina como substratos para a NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em *T. vaginalis* em uma condição padrão de cultivo, o estudo investigou o efeito de uma situação de privação de soro na modulação do perfil enzimático e da recaptação de nucleosídeos para o pool intracelular. O cultivo de *T. vaginalis* é tradicionalmente suplementado com soro bovino adulto, fonte primária de nucleosídeos para crescimento e proliferação dos trofozoítos. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa já demonstraram que em situação de privação de soro

ocorre um aumento da taxa de hidrólise dos nucleotídeos da adenina pela NTPDase e ecto-5'-nucleotidase (FRASSON et al., 2012b). Na situação de privação de purinas, houve significativo aumento da taxa de hidrólise de nucleotídeos pelas enzimas e um expressivo consumo de GTP pelos trofozoítos. Os níveis de guanosina gerados pela cascata enzimática foram superiores no grupo submetido à privação de soro, reforçando a hipótese da relevância da cascata enzimática na geração de nucleosídeos para a sobrevivência do parasito em uma situação metabólica adversa. A partir da observação do aumento da atividade enzimática, buscou-se evidenciar quais sequências entre *TvNTPDase 1* a *5* poderiam estar envolvidas com o aumento da atividade enzimática. A expressão gênica das sequências *TvNTPDase2* e *4* apresentou-se aumentada na condição de limitação de soro, o que poderia justificar o aumento da atividade enzimática.

Surpreendentemente, em relação ao metabolismo da guanosina, a condição de limitação de soro bovino não levou ao completo e rápido consumo do nucleosídeo do meio extracelular, como já previamente demonstrado para a adenosina (FRASSON et al., 2012b). Na busca da confirmação do perfil obtido pelos dados de HPLC, um experimento foi conduzido para comparar a taxa de recaptção de adenosina e guanosina em seus respectivos nucleotídeos no DNA do parasito, através da utilização de substratos marcados com ^{13}C . Após a incubação dos substratos ^{13}C -ATP e ^{13}C -GTP com os trofozoítos e a posterior hidrólise pelas enzimas, o DNA dos parasitos foi extraído e a incorporação dos nucleosídeos (produtos finais da cascata enzimática) em nucleotídeos intracelulares foi determinada. Os resultados demonstraram que adenosina tem uma maior recaptção do meio extracelular do que guanosina, confirmando o dado encontrado no HPLC e reforçando os dados da literatura que já demonstraram que adenosina é o nucleosídeo preferencial recaptado para a síntese de nucleotídeos em *T. vaginalis* (MUNAGALA & WANG, 2003). O transporte de adenosina é mais rápido do que o da guanosina e em apenas 100 segundos, 75% da adenosina extracelular é recaptada para compor o *pool*

intracelular de nucleotídeos (HARRIS et al., 1988). O dado inédito de recaptção de guanosina em uma situação restritiva de purinas, contribui para o conhecimento acerca do metabolismo de nucleotídeos no parasito e evidencia a necessidade de mais estudos que elucidem os mecanismos de transporte e recaptção desses compostos em *T. vaginalis*. O acúmulo de guanosina extracelular nos levou a propor a hipótese de que níveis aumentados deste nucleosídeo poderiam ser vantajosos para o parasito dentro de um contexto de sobrevivência em um sítio de infecção, visto que a adenosina com propriedades anti-inflamatórias é rapidamente consumida (via enzimática ou por recaptção), ao contrário da guanosina que permanece acumulada no microambiente extracelular.

Diante dos resultados observados para a guanosina, projetou-se o Capítulo II dessa tese, objetivando-se investigar o papel extracelular da guanosina na modulação da patogênese de *T. vaginalis*. Como um patógeno de mucosa extracelular, *T. vaginalis* deve aderir às células epiteliais hospedeiras da vagina, cérvix ou próstata e em um segundo estágio, os trofozoítos sofrem uma drástica transformação morfológica que desencadeia o mecanismo de citotoxicidade, resultando em citólise, fagocitose e desintegração das monocamadas de células. Sabendo-se que os nucleotídeos e nucleosídeos desencadeiam papéis antagônicos na mediação de eventos de citotoxicidade e inflamação, o próximo objetivo foi avaliar o possível papel dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares na citotoxicidade mediada pelos trofozoítos em uma linhagem de células epiteliais vaginais humanas (HMVII). Inicialmente, foi realizado um *screening* a fim de investigar o perfil de citotoxicidade de diferentes isolados clínicos frescos e de longo tempo de cultivo. Todos os isolados estimularam a liberação de lactato desidrogenase (LDH) pelas células; entretanto, um perfil bastante heterogêneo foi observado, com destaque para o isolado TV-LACM6 que apresentou a maior taxa de citólise. O perfil heterogêneo de citotoxicidade obtido está de acordo com dados da literatura que

demonstram diferenças na capacidade de citólise de isolados de *T. vaginalis* (RYAN et al., 2011; LUSTIG et al., 2013).

Considerando-se que ATP extracelular e nucleotídeos são moléculas associadas ao dano celular e que sua liberação é desencadeada em resposta à infecção ou dano tecidual, a sequência do trabalho investigou o papel dos nucleotídeos ATP e GTP e nucleosídeos adenosina e guanosina na modulação da citotoxicidade mediada pelo parasito. Os dados obtidos demonstraram que ambos os nucleotídeos ATP e GTP quando adicionados ao meio de co-cultivo de *T. vaginalis* com células HMVII foram capazes de aumentar a citotoxicidade do isolado clínico TV-LAC M6 frente à linhagem celular. O acúmulo de ATP no meio extracelular, obtido pela adição de gadolínio potencializou o efeito de liberação de LDH celular. Quando o efeito dos nucleosídeos adenosina e guanosina foi avaliado, não se observou redução da citotoxicidade, apenas quando se utilizou o inibidor da adenosina deaminase (EHNA). Demonstrou-se, portanto, que a adenosina acumulada, na presença do inibidor, mas não a guanosina, reduz a citotoxicidade dos trofozoítos frente à célula hospedeira. A ausência de um efeito citoprotetor atribuído à guanosina não é surpreendente, considerando que o perfil enzimático obtido para o isolado TV-LACM6 demonstra maior atividade de ecto-5'-nucleotidase frente ao nucleotídeo GMP em comparação ao AMP. Essa característica promove uma menor produção adenosina em relação à guanosina como produto final da cascata enzimática. Deve-se ainda salientar que nesse modelo a guanosina não apresentou efeito na proteção ao dano celular promovido pelos trofozoítos, porém a literatura é bastante vasta em relação ao papel protetor do nucleosídeo em outros modelos de dano celular e tecidual envolvendo distintos tipos celulares (SCHMIDT et al., 2000; CITTOLIN-SANTOS et al., 2016).

A investigação do receptor de adenosina envolvido no efeito observado foi conduzida pela adição de cafeína, um antagonista de receptores P1. Conforme esperado, a co-incubação com cafeína reverteu o efeito na citotoxicidade obtido

com a condição de acúmulo de adenosina promovida pelo inibidor da adenosina deaminase. A fim de investigar o subtipo de receptor envolvido, o efeito de agonistas e antagonistas de receptores A1 e A2A foi avaliado, porém não foi possível definir qual o receptor diretamente envolvido no processo, já que o percentual de LDH liberado pelas células foi semelhante em todos os grupos tratados. Deve-se salientar que não foi realizada a avaliação da participação dos receptores A2B e A3, perspectiva que se abre para o encerramento desse ponto do trabalho.

A busca pelo conhecimento de novos alvos terapêuticos e rotas bioquímicas alternativas na tentativa de desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento da tricomoníase é de urgente necessidade, visto que a opção terapêutica atual é restrita a uma única classe de fármacos com limitações bastante consideráveis, especialmente em relação ao surgimento de resistência e inefetividade terapêutica. Nesse sentido, os dados obtidos no Capítulo III vêm ao encontro dessa demanda, através do estudo da atividade de compostos frente ao *T. vaginalis* que apresentem efeito na modulação da cascata enzimática das ectonucleotidases. Inicialmente, o estudo avaliou a atividade frente ao *T. vaginalis* de 11 derivados de floroglucinois, obtidos de espécies de *Hypericum* da região sul brasileira. A partir da obtenção dos IC₅₀, observou-se que os compostos isoastrobrasilol B, isohiperbrasilol B e isouliginosina B apresentaram as atividades mais promissoras. Em relação à avaliação de possíveis mecanismos citotóxicos, realizou-se o ensaio de hemólise que não evidenciou efeito hemolítico frente aos eritrócitos humanos. A avaliação da toxicidade frente às células epiteliais vaginais mamíferas (HMVII) não demonstrou índices de seletividade adequados, demonstrando potencial de citotoxicidade *in vitro*. A fim de confirmar a citotoxicidade, um ensaio avaliando-se o efeito tóxico *in vivo* do composto com maior atividade frente ao *T. vaginalis* foi realizado. O modelo de *Galleria mellonella* tem sido utilizado para a investigação da virulência de diversos patógenos humanos (bactérias e fungos), devido às semelhanças entre o sistema imune inato desses insetos e

mamíferos (KAVANAGH & FALLON, 2010). Além disso, a toxicidade de compostos também vem sendo descrita neste modelo, como demonstrado por Gilbreel e Upton, que avaliaram a toxicidade da epidermicina, um peptídeo antimicrobiano com atividade contra bactérias Gram-positivas (GIBREEL & UPTON, 2013). Os resultados demonstrados apontam para ausência de toxicidade *in vivo* para o composto isoastrobrasilol B, uma vez que a sobrevivência das larvas nos grupos tratados, nas três diferentes doses, foi igual ao grupo controle.

Considerando que o ATP desempenha um papel pró-inflamatório bem estabelecido e que a adenosina apresenta um papel imunomodulador importante através do recrutamento de células imunes e modulação de citocinas pró-inflamatórias, a inibição das enzimas que regulam o balanço extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos pode aumentar a suscetibilidade de *T. vaginalis* frente à resposta imune das células hospedeiras. Estudos prévios demonstram que compostos da classe dos alcaloides foram capazes de inibir fortemente a atividade dessas enzimas em *T. vaginalis*, levando ao acúmulo de ATP extracelular e reduzindo as concentrações de adenosina (GIORDANI et al., 2010). Os três derivados com maior atividade frente ao *T. vaginalis* foram avaliados em relação ao potencial de modular a hidrólise de nucleotídeos, em trofozoítos tratados por 24 horas. Para o composto isoastrobrasilol B, uma redução significativa na atividade de NTPDase e ecto-5' nucleotidase foi observada, visto que a hidrólise dos nucleotídeos foi menor nesse grupo tratado em relação ao grupo controle sem tratamento. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa já demonstraram a inibição das ectonucleotidases pelos alcaloides licorina e candimina (GIORDANI et al., 2010). O acúmulo extracelular de nucleotídeos pode desencadear cascatas de sinalização que levam ao recrutamento de células e mediadores imunes e com isso o desencadeamento de resposta imune do hospedeiro frente ao parasito. Nesse sentido, o sucesso da tricomoníase pode ser favorecida pela associação de dois mecanismos de ação: a atividade de compostos que promovam a morte dos trofozoítos e a

modulação de cascatas bioquímicas cruciais para a sobrevivência do parasito e que modulam respostas imunes.

Em relação aos mecanismos imunes envolvidos na tricomoníase, sabe-se que os neutrófilos são as principais células do sistema imune recrutadas para o sítio da infecção. A fim de avaliar um possível envolvimento do acúmulo de nucleotídeos extracelulares promovido pela redução da atividade enzimática em parâmetros de resposta imune, avaliou-se o efeito do tratamento com isoastrobrasilol B sobre neutrófilos estimulados com *T. vaginalis*. Em *T. vaginalis*, Song et al. (SONG et al., 2008) já demonstraram que trofozoítos aumentam o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) em neutrófilos, tendo um importante papel na apoptose dessas células imunes. A liberação de ROS, um marcador de resposta imune inata, por neutrófilos, foi avaliada, porém os trofozoítos tratados não estimularam a liberação desses mediadores. Em seguida, avaliou-se se a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-8 poderia ser modulada. IL-8 é uma importante quimiocina que facilita o desencadeamento de resposta imune através da atração de neutrófilos e outros fagócitos para o sítio de infecção. No contexto da tricomoníase, neutrófilos (RYU et al., 2004), monócitos (SHAIQ et al., 1995), células vaginais, cervicais (FICHOROVA et al., 2016) e prostáticas (SEO et al., 2014) liberam IL-8 em resposta a *T. vaginalis*. O tratamento com astrobrasilol B não alterou a liberação de IL-6 por neutrófilos, porém levou a uma significativa liberação de IL-8 pelos neutrófilos. Associando-se os dados obtidos para a atividade enzimática e para os efeitos imunes mediados em neutrófilos, pode-se propor a hipótese de que o composto altera a hidrólise de nucleotídeos, favorecendo o acúmulo dessas moléculas que desencadearão a sinalização para respostas imunes, em especial a liberação de IL-8 secretada por neutrófilos e com isso, favorece a resposta do hospedeiro frente ao *T. vaginalis*.

Finalmente, a tese aqui apresentada avaliou a importância da sinalização purinérgica na patogênese da tricomoníase, especialmente em relação a distintos

aspectos: pela primeira vez, avaliou-se os aspectos bioquímicos das enzimas em relação aos nucleotídeos da guanina e o papel crucial da modulação dessa cascata em uma situação de restrição metabólica; o papel do GTP e da guanosina na citotoxicidade mediada pelos trofozoítos frente às células epiteliais hospedeiras; e o potencial terapêutico da modulação da cascata enzimática das ectonucleotidases como um adjuvante na terapia da tricomoníase, através do aumento da suscetibilidade do parasito frente à resposta imune do hospedeiro. Dessa forma, o capítulo II. 1 relacionou-se aos aspectos bioquímicos e enzimáticos do parasito, enquanto que os capítulos II. 2 e 3 demonstraram a participação dos nucleotídeos e nucleosídeos na citotoxicidade mediada pelo *T. vaginalis* e a atividade de compostos frente ao parasito, utilizando-se linhagem celulares, neutrófilos e o recente modelo de *Galeria melonella* como ferramentas de estudo. A diversidade de metodologias e técnicas empregadas, bem como dos modelos celulares reforçam a complexidade do estudo de sistema purinérgico em parasitos. Os resultados obtidos ampliam inúmeras possibilidades e desafios para a investigação de novos aspectos bioquímicos e da patogênese da tricomoníase, bem como para a busca de novos compostos com mecanismos de ação distintos daqueles utilizados atualmente na terapia antiparasitária.



III. 2. Conclusões Gerais

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

Do capítulo II. 1

- Os nucleotídeos da guanina são substratos para NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em diferentes isolados de *T. vaginalis*;
- Os parâmetros cinéticos obtidos foram compatíveis para os esperados para as enzimas dessa família;
- A hidrólise dos nucleotídeos é aumentada em uma situação metabólica de restrição de soro;
- A produção de guanosina, produto final da cascata enzimática, é aumentada na situação de restrição de soro, porém não há um consumo rápido do nucleosídeo;
- O aumento da atividade das NTPDases pode ser atribuído ao aumento da expressão das *Tv-NTPDase2* e *Tv-NTPDase4*;
- A guanosina é recaptada em menor quantidade ao pool intracelular dos trofozoítos e incorporada como DNA em relação à adenosina, ficando acumulada no meio extracelular.

Os resultados estão ilustrados nas Figuras 3a e 3b.

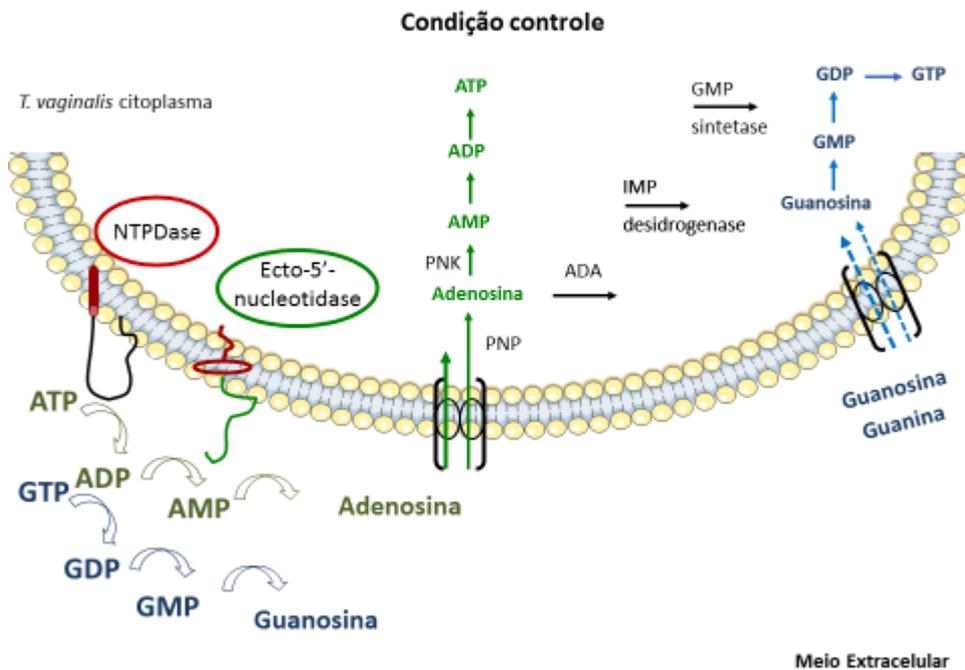


Figura 3a: Esquema de hidrólise de nucleotídeos da adenina e guanina pela NTPDase e ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis* em condição de cultivo padrão.

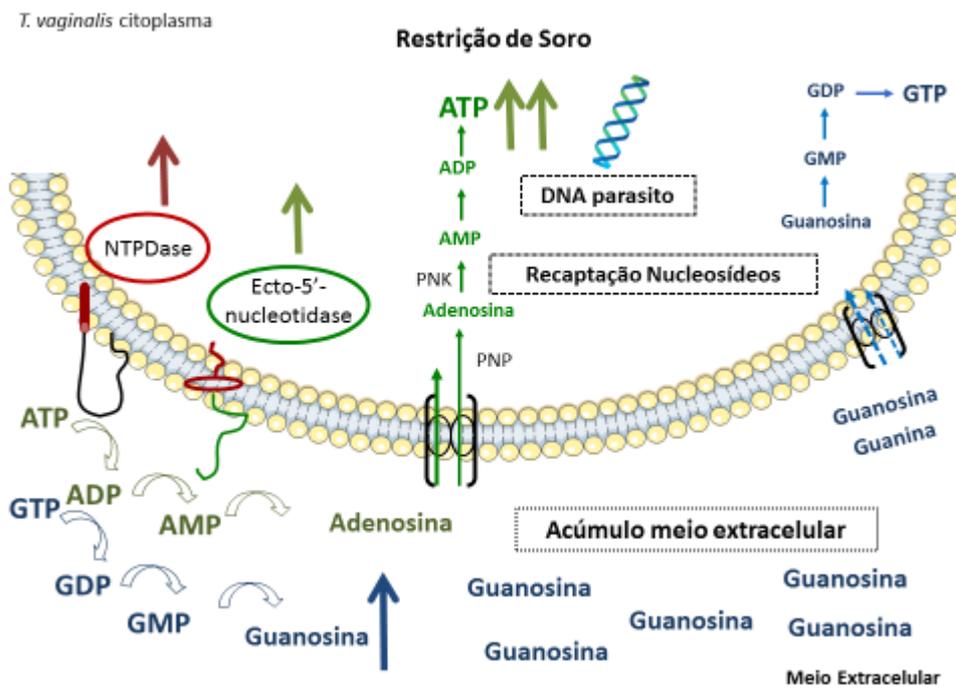


Figura 3b: Esquema de hidrólise de nucleotídeos da adenina e guanina pela NTPDase e ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis* em condição de restrição de soro bovino.

Do capítulo II. 2

- Os diferentes isolados de *T. vaginalis* exibiram perfil heterogêneo de citotoxicidade em relação às células epiteliais vaginais humanas HMVII;
- O isolado TV- LACM6 apresentou a maior citotoxicidade frente à linhagem celular;
- Os nucleotídeos ATP e GTP promoveram um aumento da citotoxicidade, em especial o acúmulo de ATP, obtido através da incubação com gadolínio, inibidor de NTPDase;
- O acúmulo de adenosina promovido pelo inibidor da adenosina deaminase, promoveu a reversão do efeito citotóxico causado pelo isolado TV-LACM6;
- Guanosina não foi capaz de reverter a citotoxicidade;
- O efeito citoprotetor conferido pelo acúmulo de adenosina foi revertido pela cafeína, antagonista de receptores P1; porém, não foi possível caracterizar o subtipo de receptor de adenosina envolvido no efeito observado.

Os resultados estão ilustrados na Figura 4.

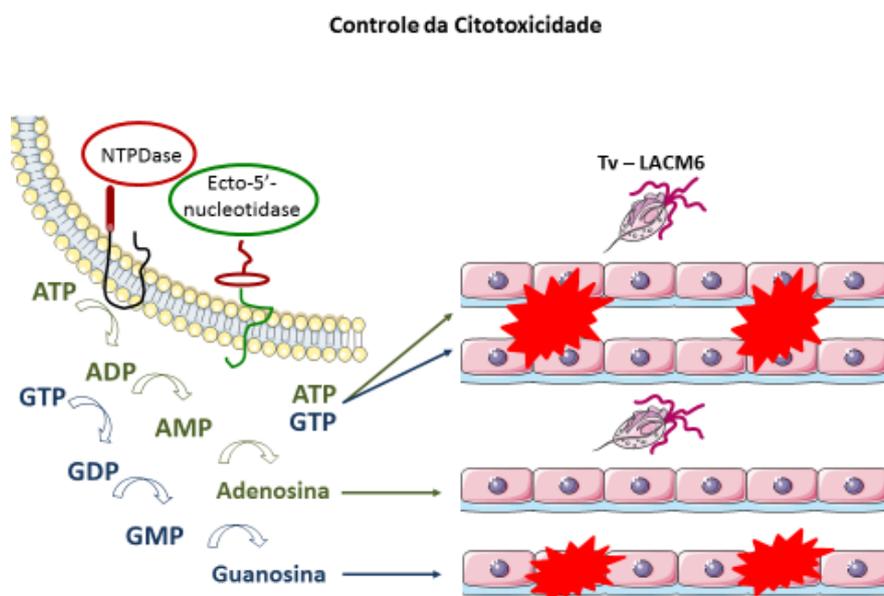


Figura 4: Citotoxicidade mediada pelo isolado Tv – LACM6 frente à linhagem celular HMVII.

Do capítulo II.3

- Os derivados de floroglucinol apresentam promissora atividade anti-*T. vaginalis*, especialmente os isolados isoastrobrasilol B, isohiperbrasilol B e isouliginosina B;
- Os três derivados não apresentaram efeito hemolítico sobre eritrócitos humanos, porém apresentaram efeito citotóxico *in vitro* frente à linhagem de células epiteliais vaginais HMVII;
- O modelo *in vivo* demonstrou ausência de toxicidade para o composto isoastrobrasilol B no modelo de *Galleria melonella*;
- Dos três compostos testados, apenas o isoastrobrasilol B foi capaz de reduzir a atividade enzimática das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase;
- O potencial de modulação de aspectos imunes foi investigado em neutrófilos co-incubados com trofozoítos tratados com isoastrobrasilol B; a liberação de ROS e de IL-6 não foi alterada; ao contrário, os níveis de IL-8 produzidos por neutrófilos co-incubados com trofozoítos tratados foi significativamente maior do que no grupo controle, indicando uma possível ação adjuvante do composto na eliminação do parasito através da estimulação da resposta imune.

Os resultados estão ilustrados na Figura 5.

Tratamento Isoaustrobrasilol B

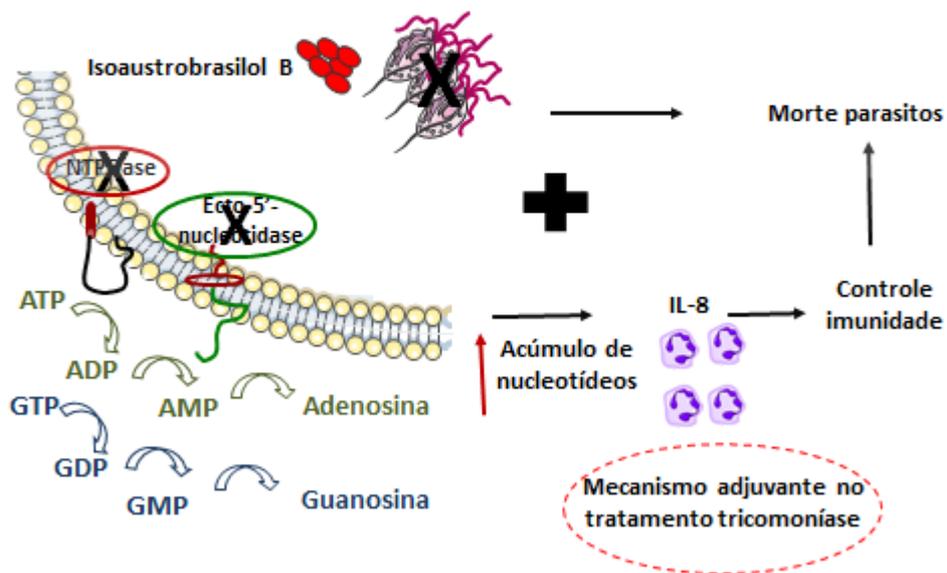


Figura 5: Efeito do derivado isoaustrobrasilol B na morte dos trofozoítos de *T. vaginalis*: redução da viabilidade dos trofozoítos e modulação de resposta imune via inibição da cascata enzimática da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase.

Do capítulo II.2

- Avaliar o envolvimento da sinalização mediada pela guanosina e adenosina na citotoxicidade de trofozoítos frente às células epiteliais prostáticas (CEPs);
- Avaliar a participação dos receptores A2B e A3 no mecanismo protetor da adenosina.

Do capítulo II.3

- Investigar o efeito de isoautrobrasilol B na expressão gênica da NTPDase de *T. vaginalis* (*TvNTPDase 1-5*);
- Avaliar a associação de isoautrobrasilol B com metronidazol frente a um isolado de *T. vaginalis* resistente ao metronidazol a fim de testar a hipótese de mecanismo adjuvante do derivado de floroglucinol.

III.4. Referências

- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A.; ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci*, v.32, n.1, p.19-29, 2009.
- AIRAS, L.; HELLMAN, J.; SALMI, M.; BONO, P.; PUURUNEN, T.; SMITH, D. J.; JALKANEN, S. CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med*, v.182, n.5, p.1603-8, 1995.
- ASAI, T.; MIURA, S.; SIBLEY, L. D.; OKABAYASHI, H.; TAKEUCHI, T. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*, v.270, n.19, p.11391-7, 1995.
- BAQI, Y.; WEYLER, S.; IQBAL, J.; ZIMMERMANN, H.; MULLER, C. E. Structure-activity relationships of anthraquinone derivatives derived from bromaminic acid as inhibitors of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases). *Purinergic Signal*, v.5, n.1, p.91-106, 2009.
- BLACKBURN, M. R.; KELLEMS, R. E. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Adv Immunol*, v.861-41, 2005.
- BOURS, M. J.; SWENNEN, E. L.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B. N.; DAGNELIE, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*, v.112, n.2, p.358-404, 2006.
- BRIDI, H.; CCANA-CCAPATINTA, G. V.; STOLZ, E. D.; MEIRELLES, G. C.; BORDIGNON, S. A.; RATES, S. M.; VON POSER, G. L. Dimeric acylphloroglucinols from *Hypericum austrobrasiliense* exhibiting antinociceptive activity in mice. *Phytochemistry*, v.122178-83, 2016.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*, v.64, n.12, p.1471-83, 2007a.
- BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*, v.87, n.2, p.659-797, 2007b.
- BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J. M. Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal*, v.10, n.4, p.529-64, 2014.
- CARGNIN, S. T.; VIEIRA, P. B.; CIBULSKI, S.; CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; MONTANHA, J.; ROEHE, P.; TASCIA, T.; VON POSER, G. L. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid extraction and isolated compounds. *Parasitol Int.*, v.62, n.2, p.112-117, 2013.
- CARTER, J. E.; WHITHAUS, K. C. Neonatal respiratory tract involvement by *Trichomonas vaginalis*: a case report and review of the literature. *Am J Trop Med Hyg.*, v.78, n.1, p.17-19, 2008.
- CASTILHOS, L. G.; REZER, J. F.; RUCHEL, J. B.; THORSTENBERG, M. L.; JAQUES, J. A.; SCHLEMMER, J. B.; DOLESKI, P. H.; ROSSATO, M. F.; DA SILVA, M. A.; CASALLI, E. A.; DA CRUZ, R. C.; FERREIRA, J.; ATHAYDE, M. L.; GONCALVES, J. F.; LEAL, D. B. Effect of *Uncaria tomentosa* extract on purinergic enzyme activities in lymphocytes of rats submitted to experimental adjuvant arthritis model. *BMC Complement Altern Med*, v.15189, 2015.
- 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. *Sex Transm Dis*, v.33, n.12, p.747-752, 2006.
- CHESSON, H. W.; BLANDFORD, J. M.; PINKERTON, S. D. Estimates of the annual number and cost of new HIV infections among women attributable to trichomoniasis in the United States. *Sex Transm Dis*, v.31, n.9, p.547-51, 2004.
- CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; D'ALIMONTE, I.; GIULIANI, P.; FLORIO, T.; CACIAGLI, F.; MIDDLEMISS, P. J.; RATHBONE, M. P. Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *Glia*, v.29, n.3, p.202-11, 2000.
- CITTOLIN-SANTOS, G. F.; DE ASSIS, A. M.; GUAZZELLI, P. A.; PANIZ, L. G.; DA SILVA, J. S.; CALCAGNOTTO, M. E.; HANSEL, G.; ZENKI, K. C.; KALININE, E.; DUARTE, M.

- M.; SOUZA, D. O. Guanosine Exerts Neuroprotective Effect in an Experimental Model of Acute Ammonia Intoxication. *Mol Neurobiol*, 2016.
- 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. *Sex Transm Dis*, v.24, n.6, p.353-360, 1997.
- COUTINHO-SILVA, R.; CORREA, G.; SATER, A. A.; OJCIUS, D. M. The P2X(7) receptor and intracellular pathogens: a continuing struggle. *Purinergic Signal*, v.5, n.2, p.197-204, 2009.
- DA SILVA, A. C.; BALZ, D.; DE SOUZA, J. B.; MORSCH, V. M.; CORREA, M. C.; ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; SCHETINGER, M. R. Inhibition of NTPDase, 5'-nucleotidase, Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *Casearia sylvestris*. *Phytomedicine*, v.13, n.7, p.509-14, 2006.
- DAGNINO, A. P.; BARROS, F. M.; CCANA-CCAPATINTA, G. V.; PROPHIRO, J. S.; POSER, G. L.; ROMAO, P. R. Leishmanicidal activity of lipophilic extracts of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, v.22, n.1, p.71-6, 2015.
- DE JESUS, J. B.; DE SA PINHEIRO, A. A.; LOPES, A. H.; MEYER-FERNANDES, J. R. An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. *Zeitschrift fur Naturforschung C*, v.57, n.9-10, p.890-6, 2002.
- DE KONING, H. P.; WATSON, C. J.; SUTCLIFFE, L.; JARVIS, S. M. Differential regulation of nucleoside and nucleobase transporters in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, v.106, n.1, p.93-107, 2000.
- DE SOUZA LEITE, M.; THOMAZ, R.; FONSECA, F. V.; PANIZZUTTI, R.; VERCESI, A. E.; MEYER-FERNANDES, J. R. *Trypanosoma brucei brucei*: biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Exp Parasitol*, v.115, n.4, p.315-23, 2007.
- FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M. N.; LENZI, H. L.; MOTA, E. M.; PENIDO, M. L.; COELHO, P. M.; VASCONCELOS, E. G. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization and immunocytochemical localization of a new antigen. *Parasitology*, v.129, n.Pt 1, p.51-7, 2004.
- FERRAZ, A. B.; GRIVICICH, I.; VON POSER, G. L.; FARIA, D. H.; KAYSER, G. B.; SCHWARTSMANN, G.; HENRIQUES, A. T.; DA ROCHA, A. B. Antitumor activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthum*. *Fitoterapia*, v.76, n.2, p.210-5, 2005.
- FICHOROVA, R. N.; YAMAMOTO, H. S.; FASHEMI, T.; FOLEY, E.; RYAN, S.; BEATTY, N.; DAWOOD, H.; HAYES, G. R.; ST-PIERRE, G.; SATO, S.; SINGH, B. N. *Trichomonas vaginalis* Lipophosphoglycan Exploits Binding to Galectin-1 and -3 to Modulate Epithelial Immunity. *J Biol Chem*, v.291, n.2, p.998-1013, 2016.
- FIETTO, J. L.; DEMARCO, R.; NASCIMENTO, I. P.; CASTRO, I. M.; CARVALHO, T. M.; DE SOUZA, W.; BAHIA, M. T.; ALVES, M. J.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*, v.316, n.2, p.454-60, 2004.
- FISCHER, W.; URBAN, N.; IMMIG, K.; FRANKE, H.; SCHAEFER, M. Natural compounds with P2X7 receptor-modulating properties. *Purinergic Signal*, v.10, n.2, p.313-26, 2014.
- FONSECA, F. V.; FONSECA DE SOUZA, A. L.; MARIANO, A. C.; ENTRINGER, P. F.; GONDIM, K. C.; MEYER-FERNANDES, J. R. *Trypanosoma rangeli*: characterization of a Mg-dependent ecto ATP-diphosphohydrolase activity. *Exp Parasitol*, v.112, n.2, p.76-84, 2006.
- FRANCO, R.; CASADO, V.; CIRUELA, F.; SAURA, C.; MALLOL, J.; CANELA, E. I.; LLUIS, C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol*, v.52, n.4, p.283-94, 1997.

- FRASSON, A.; CARLI, G.; BONAN, C.; TASCA, T. Involvement of purinergic signaling on nitric oxide production by neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Purinergic Signal*, v.8, n.1, p.1-9, 2012a.
- FRASSON, A. P.; DOS SANTOS, O.; MEIRELLES, L. C.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. Five putative nucleoside triphosphate diphosphohydrolase genes are expressed in *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiol Lett*, v.363, n.2, p., 2016.
- FRASSON, A. P.; CHARÃO, M. F.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P. D.; 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*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.107170-177, 2012b.
- GERO, A. M. Purine stress in crithidia: adaptation of a parasite to environmental stress. *Parasitol Today*, v.14, n.7, p.277-81, 1998.
- GIBREEL, T. M.; UPTON, M. Synthetic epidermicin NI01 can protect *Galleria mellonella* larvae from infection with *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, v.68, n.10, p.2269-73, 2013.
- GIORDANI, R. B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D. B.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; ZUANAZZI, J. A. S.; TASCA, T. *Trichomonas vaginalis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine. *Parasitol Int.*, v.59, n.2, p.226-231, 2010.
- GORGEN, M.; TURATTI, K.; MEDEIROS, A. R.; BUFFON, A.; BONAN, C. D.; SARKIS, J. J.; PEREIRA, G. S. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* decreases nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *J Ethnopharmacol*, v.97, n.1, p.73-7, 2005.
- GOUNARIS, K.; SELKIRK, M. E. Parasite nucleotide-metabolizing enzymes and host purinergic signalling. *Trends Parasitol*, v.21, n.1, p.17-21, 2005.
- HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun*, v.218, n.3, p.916-23, 1996.
- HARRIS, D. I.; BEECHEY, R. B.; LINSTEAD, D.; BARRETT, J. Nucleoside uptake by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*, v.29, n.2-3, p.105-16, 1988.
- HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E.; GINGER, C. D. Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett*, v.141, n.1, p.106-110, 1982.
- HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E.; GINGER, C. D. Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett*, v.176, n.1, p.55-60, 1984.
- HU, L. H.; KHOO, C. W.; VITTAL, J. J.; SIM, K. Y. Phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum*. *Phytochemistry*, v.53, n.6, p.705-9, 2000.
- IDZKO, M.; FERRARI, D.; RIEGEL, A. K.; ELTZSCHIG, H. K. Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. *Blood*, v.124, n.7, p.1029-37, 2014.
- ISHIGURO, K.; YAMAKI, M.; KASHIHARA, M.; TAKAGI, S. Sarospidin A, B, and C: additional antibiotic compounds from *Hypericum japonicum*. *Planta Med*, v.53, n.5, p.415-7, 1987.
- JACKSON, E. K.; CHENG, D.; JACKSON, T. C.; VERRIER, J. D.; GILLESPIE, D. G. Extracellular guanosine regulates extracellular adenosine levels. *Am J Physiol Cell Physiol*, v.304, n.5, p.C406-21, 2013.
- JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, v.5, n.3, p.247-64, 2006.
- JAGROOP, I. A. Plant extracts inhibit ADP-induced platelet activation in humans: their potential therapeutic role as ADP antagonists. *Purinergic Signal*, v.10, n.2, p.233-9, 2014.
- JESUS, J. B.; LOPES, A. H.; MEYER-FERNANDES, J. R. Characterization of an ecto-ATPase of *Trichomonas foetus*. *Vet Parasitol*, v.103, n.1-2, p.29-42, 2002.
- KAVANAGH, K.; FALLON, J. P. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biol Rev.*, v.24, n.1-2, p.79-83, 2010.
- KIRLEY, T. L. Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase. Homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *J Biol Chem*, v.272, n.2, p.1076-81, 1997.

- KOBAYASHI, D.; OHKUBO, S.; NAKAHATA, N. Contribution of extracellular signal-regulated kinase to UTP-induced interleukin-6 biosynthesis in HaCaT keratinocytes. *J Pharmacol Sci*, v.102, n.4, p.368-76, 2006.
- LUSTIG, G.; RYAN, C. M.; SECOR, W. E.; JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis* contact-dependent cytolysis of epithelial cells. *Infect Immun*, v.81, n.5, p.1411-9, 2013.
- MAKARENKOVA, H. P.; SHESTOPALOV, V. I. The role of pannexin hemichannels in inflammation and regeneration. *Front Physiol*, v.563, 2014.
- MATOS, J. A. A.; BORGES, F. P.; TASCA, T.; BOGO, M. C. 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*. *Int J Parasitol*, v.31, n.8, p.770-775, 2001.
- MESTRES, J. Representativity of target families in the Protein Data Bank: impact for family-directed structure-based drug discovery. *Drug Discov Today*, v.10, n.23-24, p.1629-37, 2005.
- MORIWAKI, Y.; YAMAMOTO, T.; HIGASHINO, K. Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications. *Histol Histopathol*, v.14, n.4, p.1321-40, 1999.
- MULLER, C. E.; SCIOR, T. Adenosine receptors and their modulators. *Pharm Acta Helv*, v.68, n.2, p.77-111, 1993.
- MUNAGALA, N. R.; WANG, C. C. Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*, v.127, n.2, p.143-9, 2003.
- MUZNY, C. A.; SCHWEBKE, J. R. The clinical spectrum of *Trichomonas vaginalis* infection and challenges to management. *Sex Transm Infect*, v.89, n.6, p.423-425, 2013.
- OWUSU-EDUSEI, K., JR.; CHESSON, H. W.; GIFT, T. L.; TAO, G.; MAHAJAN, R.; OCFEMIA, M. C.; KENT, C. K. The estimated direct medical cost of selected sexually transmitted infections in the United States, 2008. *Sex Transm Dis*, v.40, n.3, p.197-201, 2013.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, v.50, n.3, p.413-92, 1998.
- RAPAPORT, E.; ZAMECNIK, P. C. Increased incorporation of adenosine into adenine nucleotide pools in serum-deprived mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.75, n.3, p.1145-7, 1978.
- ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*, v.2, n.2, p.409-30, 2006a.
- ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*, v.2, n.2, p.409-30, 2006b.
- ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M. A. C.; HOSTETTSMANN, K. More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v.42, n.1, p.185-188, 1996.
- ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M. A.; STOECKLI-EVANS, H.; HOSTETTSMANN, K. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v.40, n.5, p.1447-52, 1995.
- RÜCKERT, C.; STUEPP, C. D. S.; GOTTARDI, B.; ROSA, J.; CISILOTTO, J.; BORGES, F. P.; ROSEMBERG, D. B.; BOGO, M. R.; TASCA, T.; DE CARLI, G. A.; BONAN, C. D. *Trichomonas vaginalis*: Dehydroepiandrosterone sulfate and 17 β -estradiol alter NTPDase activity and gene expression. *Exp Parasitol*, v.125, n.3, p.187-195, 2010.
- RYAN, C. M.; DE MIGUEL, N.; JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis*: current understanding of host-parasite interactions. *Essays Biochem*, v.51161-175, 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*. *Infect Immun*, v.72, n.3, p.1326-32, 2004.
- SANSOM, F. M.; ROBSON, S. C.; HARTLAND, E. L. Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiol Mol Biol Rev*, v.72, n.4, p.765-81, Table of Contents, 2008a.

- SANSOM, F. M.; ROBSON, S. C.; HARTLAND, E. L. Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiol Mol Biol Rev*, v.72, n.4, p.765-781, 2008b.
- SANSOM, F. M.; RIEDMAIER, P.; NEWTON, H. J.; DUNSTONE, M. A.; MULLER, C. E.; STEPHAN, H.; BYRES, E.; BEDDOE, T.; ROSSJOHN, J.; COWAN, P. J.; D'APICE, A. J.; ROBSON, S. C.; HARTLAND, E. L. Enzymatic properties of an ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase from *Legionella pneumophila*: substrate specificity and requirement for virulence. *J Biol Chem*, v.283, n.19, p.12909-18, 2008c.
- SAÚDE, M. D. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids – Brasília : Ministério da Saúde. . v.2008, n.Série G.Estatística e Informação em Saúde). p.224, 2005.
- SCHMIDT, A. P.; LARA, D. R.; SOUZA, D. O. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther*, v.116, n.3, p.401-16, 2007.
- SCHMIDT, A. P.; LARA, D. R.; DE FARIA MARASCHIN, J.; DA SILVEIRA PERLA, A.; ONOFRE SOUZA, D. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res*, v.864, n.1, p.40-3, 2000.
- SCHWEBKE, J. R.; BARRIENTES, F. J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrob Agents Chemother*, v.50, n.12, p.4209-4210, 2006.
- SECOR, W. E.; MEITES, E.; STARR, M. C.; WORKOWSKI, K. A. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. *Am J Trop Med Hyg.*, v.90, n.5, p.800-804, 2014.
- SEO, M. Y.; IM, S. J.; GU, N. Y.; KIM, J. H.; CHUNG, Y. H.; AHN, M. H.; RYU, J. S. Inflammatory response of prostate epithelial cells to stimulation by *Trichomonas vaginalis*. *Prostate*, v.74, n.4, p.441-9, 2014.
- SHAIO, M. F.; LIN, P. R.; LIU, J. Y.; YANG, K. D. Generation of interleukin-8 from human monocytes in response to *Trichomonas vaginalis* stimulation. *Infect Immun*, v.63, n.10, p.3864-70, 1995.
- SHI, J. D.; KUKAR, T.; WANG, C. Y.; LI, Q. Z.; CRUZ, P. E.; DAVOODI-SEMIROMI, A.; YANG, P.; GU, Y.; LIAN, W.; WU, D. H.; SHE, J. X. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *J Biol Chem*, v.276, n.20, p.17474-8, 2001.
- SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases1. *Biochim Biophys Acta*, v.1386, n.1, p.65-78, 1998.
- SONG, H. O.; SHIN, M. H.; AHN, M. H.; MIN, D. Y.; KIM, Y. S.; RYU, J. S. *Trichomonas vaginalis*: reactive oxygen species mediates caspase-3 dependent apoptosis of human neutrophils. *Exp Parasitol*, v.118, n.1, p.59-65, 2008.
- SPYCHALA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther*, v.87, n.2-3, p.161-73, 2000.
- STOLZ, E. D.; HASSE, D. R.; VON POSER, G. L.; RATES, S. M. Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative, presents a multimediated antinociceptive effect in mice. *J Pharm Pharmacol*, v.66, n.12, p.1774-85, 2014.
- STOLZ, E. D.; DA COSTA, P. F.; MEDEIROS, L. F.; SOUZA, A.; BATTASTINI, A. M.; VON POSER, G. L.; BONAN, C.; TORRES, I. L.; RATES, S. M. Uliginosin B, a Possible New Analgesic Drug, Acts by Modulating the Adenosinergic System. *Evid Based Complement Alternat Med*, v.20165890590, 2016.
- SUTCLIFFE, S.; NEACE, C.; MAGNUSON, N. S.; REEVES, R.; ALDERETE, J. F. Trichomonosis, a common curable STI, and prostate carcinogenesis--a proposed molecular mechanism. *PLoS Pathog*, v.8, n.8, p.e1002801, 2012.
- 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. *Parasitol Res*, v.93, n.4, p.300-3, 2004.

- TASCA, T.; BONAN, C. D.; CARLI, G. A.; BATTASTINI, A. M.; SARKIS, J. J. Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Exp Parasitol*, v.105, n.2, p.167-73, 2003.
- TRAVERSA, U.; BOMBI, G.; CAMAIONI, E.; MACCHIARULO, A.; COSTANTINO, G.; PALMIERI, C.; CACIAGLI, F.; PELLICCIARI, R. Rat brain guanosine binding site. Biological studies and pseudo-receptor construction. *Bioorg Med Chem*, v.11, n.24, p.5417-25, 2003.
- VAN DER POL, B.; KWOK, C.; PIERRE-LOUIS, B.; RINALDI, A.; SALATA, R. A.; CHEN, P. L.; VAN DE WIJGERT, J.; MMIRO, F.; MUGERWA, R.; CHIPATO, T.; MORRISON, C. S. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *J Infect Dis*, v.197, n.4, p.548-54, 2008.
- VASCONCELOS, E. G.; NASCIMENTO, P. S.; MEIRELLES, M. N.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; FERREIRA, S. T. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*, v.58, n.2, p.205-14, 1993.
- VERLINDE, C. L.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PERIE, J. J.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W. G.; MICHELS, P. A. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Updat*, v.4, n.1, p.50-65, 2001.
- VIIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncol*, v.39, n.1, p.71-5, 2000.
- WANG, C. C.; MCCLELLAND, R. S.; REILLY, M.; OVERBAUGH, J.; EMERY, S. R.; MANDALIYA, K.; CHOHAN, B.; NDINYA-ACHOLA, J.; BWAYO, J.; KREISS, J. K. The effect of treatment of vaginal infections on shedding of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*, v.183, n.7, p.1017-22, 2001.
- WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-apyrase. *J Biol Chem*, v.271, n.17, p.9898-901, 1996.
- WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. *J Biol Chem*, v.273, n.18, p.11392-9, 1998.
- WEIZENMANN, M.; FRASSON, A. P.; DE BARROS, M. P.; B., V. P.; 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 Microbiol Lett*, v.319, n.2, p.115-24, 2011.
- WHO. 2012. **Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections: 2008: World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, 2012 ISBN 978 92 4 150383 9.** Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968808012406607?showall=true>. Acesso em: 40.
- YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*, v.1783, n.5, p.673-94, 2008.
- ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J*, v.285 (Pt 2)345-65, 1992.
- ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci*, v.20, n.6, p.231-6, 1999.
- ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v.362, n.4-5, p.299-309, 2000.
- ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research*, v.52, n.1-2, p.44-56, 2001.



III. 5. Anexo

**Artigos Científicos Publicados no Período de Vigência do Doutorado
(agosto 2012-julho 2016)**

1. Comparison of permanent staining methods for the laboratory diagnosis of trichomoniasis.

Menezes CB, Mello M dos S, Tasca T.

Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2016.

2. Constituído por artigo científico aceito para publicação, conforme referência abaixo, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 164-179.

Trichomoniasis immunity and the involvement of the purinergic signaling

Camila Braz Menezes e Tiana Tasca.

RESUMO DO ARTIGO:

A imunidade inata e adaptativa desempenham um papel significativo na tricomoníase, a doença sexualmente transmissível não-viral mais comum no mundo. No trato urogenital, a imunidade inata é caracterizada por uma barreira física de defesa constituída por células epiteliais, muco e pH ácido. Durante a infecção, as células do sistema imunológico, os peptídeos antimicrobianos, citocinas, quimiocinas, e imunidade adaptativa levam a uma resposta pró-inflamatória no sítio da infecção a fim de eliminar o agente patogênico extracelular *Trichomonas vaginalis*. No entanto, o parasito desenvolveu mecanismos evolutivos complexos para fugir da resposta imune do hospedeiro através da liberação de cisteína proteases, variação fenotípica e mimetismo molecular. O sistema purinérgico constitui uma rede de sinalização celular, onde nucleotídeos e nucleosídeos, enzimas,

purinoceptores e transportadores estão envolvidos em quase todas as células e tecidos, especialmente em sistema nervoso central e autônomo, além de sistemas endócrino, respiratório, cardíaco, reprodutivo. No sistema imunológico, tanto em situações de homeostase quanto em processos patológicos essa sinalização tem papel chave. O envolvimento do sistema purinérgico na biologia do *T. vaginalis* e durante o curso da infecção foi demonstrado nesta revisão, que destaca em especial, a participação desta via de sinalização nas estratégias do parasito durante a evasão da resposta imune.

