

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

Hidrólise extracelular de nucleotídeos em *Trichomonas vaginalis*: modulação
enzimática pelo ferro e propriedades estruturais

PATRÍCIA DE BRUM VIEIRA

PORTO ALEGRE, 2011

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

Hidrólise extracelular de nucleotídeos em *Trichomonas vaginalis*: modulação
enzimática pelo ferro e propriedades estruturais

Dissertação apresentada por

Patrícia de Brum Vieira para obtenção do GRAU

DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dr. Tiana Tasca

Porto Alegre, 2011

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 18/11/2011 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Andréia Buffon

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Carla Denise Bonan

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Marilise Brites. Rott

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Vieira, Patrícia de Brum

Hidrólise extracelular de nucleotídeos em *Trichomonas vaginalis*: modulação enzimática pelo ferro e propriedades estruturais / Patrícia de Brum Vieira. -- 2011.

xiv; 111 f.

Orientadora: Tiana Tasca.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. *Trichomonas vaginalis*. 2. Sistema purinérgico. 3. Fatores de virulência. 4. Patogenicidade. 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).

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A estudante recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Ao **Frederico**, meu grande amor, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por me proporcionar tantas oportunidades.

A Profa. Dr Tiana Tasca, exemplo de profissional competente, dedicado, ético e humano, pela orientação, ensinamentos, disponibilidade, apoio, compreensão e empolgação. Pela amizade e convívio. Agradeço imensamente pela paciência e por acreditar em mim e por me fazer acreditar que é possível.

Aos meus queridos colegas de Laboratório de Pesquisa em Parasitologia-SisPPP – Clara, Amanda, Adrine, Odelta, Muriel, Nicolas, Dejoara, Débora, Grazi, Paula e Júlia. Agradeço pela troca de conhecimentos, pela convivência e pela amizade construída. Pelas conversas e risadas que tornam o ambiente de trabalho tão agradável. Pelos momentos de descontração fora do laboratório. Muito obrigada pela ajuda de todos vocês no desenvolvimento desta dissertação. Agradeço especialmente ao Nicolas pela ajuda, principalmente nos finais de semana.

Às ex-colegas de Laboratório, Raquel Giordani e Marina Weizenmann, pela grande amizade e convívio. Pelo exemplo de dedicação e esforço.

Ao Prof. Dr. Alexandre Macedo e seu grupo de pesquisa pela troca de experiências, convivência e amizade.

A todos os colaboradores que participaram do desenvolvimento desta dissertação, muito obrigada pelo auxílio e colaboração.

À CAPES pelo auxílio financeiro durante o mestrado. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Geraldo Attilio De Carli por me apresentar o mundo fascinante da Parasitologia e possibilitar os primeiros passos no mundo da pesquisa.

Aos meus queridos amigos de Graduação, Marcelino, Melina e Cristiane, pelos momentos descontraídos e divertidos juntos.

Aos meus pais, Luiz e Lúcia, agradeço pela educação que me proporcionaram e por todos os ensinamentos que me deram ao longo da vida. Pelo apoio, incentivo, conforto, compreensão e amor incondicional.

À minha querida irmã Morgana, José e Renatinha, muito obrigada pelo companheirismo, amizade, apoio e incentivo.

Aos meus pais de coração, Roque e Deli, pelo carinho, conforto, incentivo orações e conversas.

Ao Filipe, Aline, Renan e Camille, muito obrigada pelo incentivo e companheirismo, pelos momentos descontraídos e de muitas risadas.

Ao meu amado, Frederico, que tantas vezes foi meu porto seguro nesta caminhada, pelo amor e companheirismo. Pelo incentivo e apoio incondicionais. Pelas conversas que me acalmavam e davam forças para continuar. Agradeço pela paciência e compreensão. Por acreditar em mim e me mostrar que sou capaz. Muito obrigada por me proporcionar a realização de mais esta conquista.

RESUMO

Trichomonas vaginalis é o agente etiológico da tricomonose, a DST não viral mais comum no mundo. Os mecanismos de patogenicidade são complexos e o ferro desempenha um papel fundamental na regulação destes. O ferro modula a atividade de enzimas envolvidas na hidrólise de nucleotídeos extracelulares, como o ATP, os quais atuam como moléculas sinalizadoras na inflamação e resposta imune. Entretanto, pouco se sabe acerca desta modulação, especialmente considerando as particularidades dos isolados de *T. vaginalis* provenientes de pacientes de diferentes sexos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do ferro na atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase. Isolados provenientes de pacientes do sexo feminino (padrões e frescos) e masculinos (somente frescos) foram tratados com quelante bipyridil, sulfato ferroso, hemoglobina e hemina. Técnicas de modelagem molecular foram utilizadas para a construção do modelo 3D da NTPDase. O ferro proveniente da hemoglobina e hemina ativaram a enzima NTPDase de isolados de pacientes do sexo feminino e a inibiram em isolados de pacientes do sexo masculino. Verificou-se um perfil de hidrólise de ATP, ADP e AMP distinto entre os isolados de pacientes do sexo feminino e masculino influenciado pela hemoglobina e hemina, indicando maior remoção do ATP citotóxico e eficiência no estabelecimento da infecção em mulheres, corroborando com a exacerbação dos sintomas observada no período pós-menstrual, onde essas fontes de ferro estão disponíveis. Os resultados revelam a participação do sistema purinérgico no estabelecimento da infecção por *T. vaginalis* através da degradação do ATP e produção de adenosina modulada pelo ferro. Modelos 3D para a NTPDase de *T. vaginalis* foram construídos. Neste contexto, a NTPDase e a ecto-5'-nucleotidase podem ser consideradas potenciais alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos fármacos anti-*T. vaginalis*.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*, ferro, NTPDase, ecto-5'-nucleotidase, patogenicidade, propriedades estruturais

ABSTRACT

Extracellular nucleotide hydrolysis in *Trichomonas vaginalis*: iron enzyme modulation and structural properties

Trichomonas vaginalis is the etiologic agent of trichomonosis, the most prevalent non-viral sexual transmitted disease. The pathogenesis mechanisms are complex and iron plays an important role in this regulation. Iron modulates the enzymes involved in extracellular nucleotide hydrolysis, as ATP, which act as signaling molecule in inflammation and immune response. However, few is known regarding this modulation, mainly considering the differences between *T. vaginalis* isolates from female and male patients. In this context, the aim of this study was to investigate the iron effect on NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities. *T. vaginalis* isolates from female (long-term grown and fresh) and male (only fresh) patients were treated with bipyridil chelator, ferrous sulfate, hemoglobin and hemin. Molecular modeling techniques were applied to build NTPDase tridimensional model. NTPDase activity was activated by hemoglobin- and hemin-treated isolates from female patients and, conversely, it was inhibited in isolates from male patients. A distinct ATP, ADP and AMP hydrolysis profile was observed between isolates from female and male patients, indicating a removal of ATP and infection establishment success in women. These findings corroborate with symptoms exacerbation observed after menstrual period, with hemoglobin and hemin availability. The results reveal the purinergic system involvement on *T. vaginalis* infection through ATP degradation and adenosine production modulated by iron. NTPDase 3D models were constructed. In this context, NTPDase and ecto-5'-nculeotidase may be considered potential therapeutic targets to anti-*T. vaginalis* new drugs development.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, iron, NTPDase, ecto-5'-nucleotidase, pathogenesis, structural properties.

SUMÁRIO

I. Introdução

I.1 <i>Trichomonas vaginalis</i>	2
I.2 Tricomonose.....	4
I.2.1 Mecanismos de patogenicidade.....	7
I.2.2 Ferro.....	12
I.3 Sistema purinérgico.....	15
I.3.1 ATP e adenosina – moléculas sinalizadoras endógenas.....	17
I.3.2 Ectonucleotidasas.....	18
I.3.2.1 Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase).....	19
I.3.2.1.1 Propriedades estruturais.....	21
I.3.2.2 Ecto-5'-nucleotidase.....	23
I.3.2.3 NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em <i>T. vaginalis</i>	23

II. Objetivos.....	25
--------------------	----

III. Artigos científicos

III.1. CAPÍTULO 1 – <u>Patrícia de Brum Vieira</u> , Nicolas Luiz Feijó Silva, Luiza Wilges Kist, Giovanna Medeiros Tavares de Oliveira, Maurício Reis Bogo, Geraldo Atillio De Carli, Alexandre José Macedo, Tiana Tasca. Iron from hemoglobin and hemin modulates NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in <i>Trichomonas vaginalis</i>	29
--	----

III.2. CAPÍTULO 2 – Modelagem molecular da enzima nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) de <i>Trichomonas vaginalis</i>	61
--	----

IV. Discussão geral.....	77
--------------------------	----

V. Conclusões gerais.....	89
---------------------------	----

VI. Perspectivas.....	93
VII. Referências.....	95
VIII. Anexos.....	109

I. Introdução

1.1 *Trichomonas vaginalis*

O *T. vaginalis* pertence à família Trichomonadidae, à ordem Trichomonadida, à classe Parabasalia e ao filo Zoomastigina (SCHEWEBKE e BURGESS, 2004). Tipicamente o parasito apresenta forma piriforme, elipsoide ou oval, no entanto, condições físico-químicas como pH, temperatura, tensão de oxigênio e força iônica podem afetar a forma. O protozoário é muito plástico e pode formar pseudópodes, os quais são usados para capturar alimentos e se fixar em superfícies sólidas (HONIGBERG e BRUGEROLLE, 1990). Ainda, uma dramática transformação morfológica é observada quando os parasitos aderem às células epiteliais vaginais (CEVs) passando da forma piriforme à ameboide (ARROYO *et al.*, 1992). O parasito apresenta apenas a forma trofozoítica, como ocorre com todos os tricomonadídeos (Figura 1). O tamanho do trofozoíto é variado, em média, apresenta 9,7 μm de comprimento por 7,0 μm de largura. O trofozoíto possui quatro flagelos anteriores livres, um flagelo recorrente aderido ao corpo pela costa, formando a membrana ondulante. O núcleo proeminente localiza-se na proximidade da extremidade anterior, com membrana dupla nuclear e frequentemente apresenta nucléolo. O axóstilo é uma estrutura rígida e hialina, que se projeta de uma extremidade à outra da célula. A pelta está presente na região anterior do corpo celular, a qual desempenha funções na sustentação e divisão celular (BENCHIMOL, 2004). Em *T. vaginalis* mitocôndrias morfológicamente reconhecíveis estão ausentes, porém o parasito contém os hidrogenossomos, os quais apresentam funções metabólicas similares às mitocôndrias e são assim denominados porque produzem hidrogênio molecular como produto final do metabolismo. Os hidrogenossomos são esféricos ou alongados, contêm uma matriz granular e, frequentemente, uma região elétrondensa (MÜLLER, 1990). Até o momento, não foi detectada a presença de ácidos nucléicos nos hidrogenossomos (BENCHIMOL, 2001).

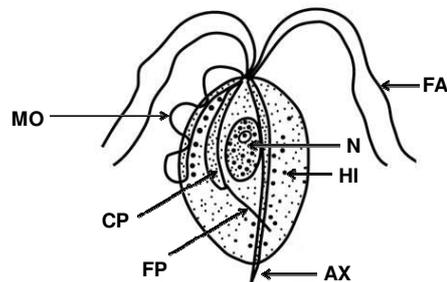


Figura 1. Morfologia do parasito *Trichomonas vaginalis*. AX – axóstilo, CP – corpo parabasal, FA – flagelos anteriores livres, FP – filamento parabasal, HI – hidrogenossomo, MO – membrana ondulante, N – núcleo. Adaptado: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Trichomoniasis.htm>

O *T. vaginalis* é um organismo que requer uma ampla quantidade de nutrientes, dentre os quais carboidratos, aminoácidos, purinas e pirimidinas, ácidos graxos, vitaminas e sais inorgânicos são indispensáveis para o crescimento do parasito. Os carboidratos são a principal fonte de energia, sendo metabolizados, tanto no citoplasma como nos hidrogenossomos, sob condições anaeróbicas ou aeróbicas formando ácidos orgânicos (LINDMARK e MÜLLER, 1973). Os principais produtos finais do metabolismo incluem acetato, lactato, glicerol e CO₂. Sob condições anaeróbicas H₂ é produzido (STEINBÜCHEL e MÜLLER, 1986; MÜLLER, 1993). Os carboidratos são preferencialmente utilizados para a obtenção de energia, no entanto, quando ocorre privação destes, aminoácidos ou proteínas digeridas são utilizados para a manutenção do crescimento e sobrevivência do *T. vaginalis* (PETRIN *et al.*, 1998). O parasito é incapaz de sintetizar ácidos graxos e esterol, dependendo, dessa forma, de fontes exógenas desses nutrientes como meios de cultura contendo soro bovino, o qual contém os ácidos graxos requeridos pelo parasito (BEACH *et al.*, 1990; 1991). Além disso, o *T. vaginalis* não realiza síntese *de novo* de nucleotídeos púricos e pirimídicos. Rotas de salvação extraordinariamente simples são utilizadas para a aquisição de nucleosídeos ou bases púricas e pirimídicas (HEYWORTH *et al.*, 1982; 1984).

Além de macromoléculas como purinas, pirimidinas e lipídeos, o parasito *T. vaginalis* requer para o crescimento vitaminas e sais inorgânicos. Dentre os sais inorgânicos, sais de ferro merecem destaque, tendo em vista o particular elevado

requerimento de ferro. A grande necessidade por este metal é atribuída à importância de proteínas contendo *clusters* ferro-enxofre que medeiam passos-chaves no metabolismo energético do parasito, onde os níveis máximos da atividade de hidrogenase, ferredoxina e piruvato:ferredoxina oxidoreductase são obtidos na presença de ferro. Dessa maneira, esses nutrientes essenciais devem ser fornecidos no meio de cultura para garantir o máximo crescimento e multiplicação dos tricomonádídeos (LINSTED, 1990). Assim, a avaliação do efeito da remoção ou adição desses nutrientes torna-se um importante campo para investigação.

I.2 Tricomonose

O *T. vaginalis* coloniza o trato urogenital humano causando a doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum no mundo. Apesar da tricomonose ser a DST mais comum, os dados de prevalência e incidência são limitados. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 340 milhões de novos casos de infecções sexualmente transmissíveis ocorreram no mundo em 1999, sendo que destes, 174 milhões eram casos de tricomonose, bem à frente dos casos de sífilis, gonorreia e clamídia, os quais juntos somam 166 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2001).

O *T. vaginalis* é um patógeno sítio-específico, assim causa infecção no trato urogenital humano e não afeta outras mucosas, por exemplo, da boca ou cólon. O parasito infecta principalmente, o epitélio escamoso, sendo a exocérvice suscetível ao ataque, enquanto que na endocérvice raramente foram encontrados organismos (REIN, 1990).

Em vários grupos de populações, quase metade dos casos de tricomonose são assintomáticos (REIN, 1990). No entanto, o espectro da tricomonose clínica em mulheres varia desde casos assintomáticos até notória vaginite. Na grande maioria das pacientes observa-se corrimento tipicamente amarelado ou esverdeado, espumoso e mucopurulento. Além disso, são observados sinais ou sintomas como irritação e prurido vulvar, pequenos pontos hemorrágicos na mucosa vaginal ou cervical acompanhados de edema e eritema, o que confere uma aparência conhecida como *colpitis macularis* ou aspecto de morango, dor abdominal inferior e

disúria (PETRIN *et al.*, 1998; SCHWEBKE e BURGESS, 2004). Os sintomas da tricomonose são cíclicos e, geralmente, tornam-se piores durante ou imediatamente após o período menstrual (PETRIN *et al.*, 1998).

Embora a tricomonose seja uma morbidade comum em mulheres, em homens a significância desta infecção é incerta. A tricomonose é geralmente assintomática, caracterizando assim, os homens como carreadores do *T. vaginalis*. Em alguns casos, os sintomas revelam uma uretrite purulenta ou sintomas clinicamente inespecíficos, os quais caracterizam uretrites não-clamidal e não-gonococal (PETRIN *et al.*, 1998; BAKARE *et al.*, 1999).

Na maioria dos casos a tricomonose é facilmente tratada. No entanto, quando o sucesso no tratamento não é obtido, sérias consequências em saúde estão associadas a este patógeno, incluindo complicações na gravidez (KLEBANOFF *et al.*, 2001), nascimentos prematuros e baixo peso de recém-nascidos (COTCH *et al.*, 1997), infertilidade (GRODSTEIN *et al.*, 1993), predisposição ao câncer cervical (VIKKI *et al.*, 2000) e doença inflamatória pélvica (CHERPES *et al.*, 2006). Além disso, a tricomonose é considerada um agente facilitador da transmissão e aquisição do vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) (SORVILLO *et al.*, 2001; VAN DER POL *et al.*, 2008). O mecanismo de facilitação não está totalmente entendido, porém, estudos demonstram que o parasito ao induzir a resposta imune, com inflamação do epitélio vaginal ou uretral, provoca uma infiltração leucocitária, incluindo as células alvo do vírus HIV, linfócitos CD4+, desta forma, o vírus pode se ligar e ganhar acesso (LEVINE *et al.*, 1998). Além disso, o *T. vaginalis* leva à formação de pontos hemorrágicos na mucosa, rompendo a barreira física ao vírus (MC CLELLAND *et al.*, 2007). Em adição, elevada carga viral é encontrada nos compartimentos seminal e cérvico-vaginal. Assim, em uma pessoa HIV-negativa, a infiltração leucocitária juntamente com os pontos hemorrágicos tornam-se uma porta de entrada para o vírus, os quais facilmente chegam à corrente circulatória. Dessa forma, medidas eficazes para o tratamento e diagnóstico da tricomonose podem contribuir grandemente para a redução da transmissão do vírus HIV.

A tricomonose é tratada com metronidazol e tinidazol, ambos derivados do grupo 5'-nitroimidazóis. Estes fármacos são os únicos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA, EUA). Atualmente preconiza-se a administração do

metronidazol conforme uma das seguintes posologias: 250 mg, via oral, três vezes ao dia durante 7 dias; 500 mg duas vezes ao dia durante 7 dias ou dose única de 2g. Esta última conduta terapêutica é a mais favorecida devido à maior adesão ao tratamento e porque uma dose total menor já é efetiva. Metronidazol e tinidazol são pró-fármacos, cujo grupamento nitro deve ser reduzido para exercer toxicidade ao parasito. A redução ocorre dentro das células ou organelas, como nos hidrogenossomos, pela ação da enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductase (PFOR), resultando em intermediários radicais-nitro citotóxicos, os quais induzem quebras nas fitas de DNA conduzindo a célula à morte (KULDA, 1999). Apesar de eficaz, o metronidazol apresenta uma série de efeitos adversos, como náusea, vômito, diarreia, desconforto abdominal, intolerância ao álcool tipo dissulfiram, vertigens, paralisias e, em casos raros, encefalopatias ou convulsões. Ainda por ser teratogênico, o uso do metronidazol em gestantes continua sendo uma barreira (ALI e NOZAKI, 2007).

Embora as taxas de cura sejam elevadas, falhas no tratamento podem ser observadas. Frequentemente, as falhas são atribuídas à não adesão ao tratamento ou reinfecção, porém fatores como a pobre absorção do fármaco ou a biodisponibilidade insuficiente também podem ser motivos de falhas no tratamento (LUMSDEN *et al.*, 1988). Entretanto, a principal causa de insucesso no tratamento é o desenvolvimento de isolados resistentes de *T. vaginalis*, sendo que a redução nas funções dos hidrogenossomos e atividade da enzima PFOR são os principais mecanismos de resistência observados em anaeróbicos como o *T. vaginalis* (BORST e OUELLETTE, 1995). Em 1989, o Center for Disease Control (NARCISI e SECOR, 1996) estimou que cerca de 5% dos *T. vaginalis* isolados de pacientes apresentavam algum nível de resistência. Considerando que 174 milhões de novos casos de tricomonose ocorrem no mundo anualmente, 5% de isolados resistentes é um fato preocupante.

Considerando que a tricomonose é um problema de saúde pública, que a terapia é restrita e que um crescente número de casos de resistência vem sendo observado, é evidente a necessidade de investigação por alternativas para o tratamento da tricomonose e por novos alvos terapêuticos. Neste contexto, o entendimento dos mecanismos envolvidos na infecção e patogênese da tricomonose

baseado na interação parasito-hospedeiro contribui para o estudo de novos alvos terapêuticos.

I.2.1 Mecanismos de patogenicidade

A patogenicidade do *T. vaginalis* é um processo complexo que envolve inúmeros passos independentes e dependentes do contato entre o parasito e o hospedeiro, sendo este último determinante para o sucesso da colonização da mucosa.

A transmissão deste parasito é praticamente exclusivamente através do contato sexual, assim o muco do trato genital é a primeira superfície do hospedeiro encontrada pelo parasito. A principal proteína que compõem o muco é a mucina, de elevado peso molecular, altamente glicosilada e com propriedades de gel. Essas características tornam a mucina uma formidável barreira física dificultando o acesso do parasito a camadas mais profundas do epitélio (GERKEN, 1993). O parasito é capaz de secretar mucinases, as quais solubilizam a matriz do muco e destacam os parasitos, os quais através do movimento flagelar, penetram na matriz solubilizada e colonizam as camadas mais profundas do epitélio (LEHKER e SWEENEY, 1999).

Em seguida ocorre a ancoragem do parasito à mucosa via proteínas de adesão denominadas adesinas, as quais desempenham um papel chave na colonização e infecção por *T. vaginalis*. As adesinas ou proteínas de adesão, AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23 (AP, do inglês *adhesion protein* e peso molecular) (ENGBRING e ALDERETE, 1998; KUCKNOOR *et al.*, 2005; MORENO-BRITO *et al.*, 2005), são expressas por famílias multigenes, indicando a importância na geração de um elevado número de moléculas protéicas bem como na multifuncionalidade dessas proteínas, visto que estas (i) atuam como adesinas no processo de adesão dos parasitos às células do hospedeiro; (ii) apresentam atividade metabólica, pois possuem elevada homologia com as enzimas hidrogenossomais: piruvato:ferredoxina oxidoreductase (PFOR), enzima málica e subunidades α - e β -succinil-CoA sintetase; (iii) podem mediar a ligação à hemoglobina para a aquisição de ferro, principalmente durante o ciclo menstrual devido à grande disponibilidade de eritrócitos, visto que o ferro é um nutriente

essencial para o parasito; e (iv) são consideradas moléculas mimetizadoras, pois, com exceção da AP120, possuem grande identidade com enzimas do hospedeiro (ALDERETE *et al.*, 1995a; ENGBRING e ALDERETE, 1998; ALDERETE *et al.*, 2001; MORENO-BRITO *et al.*, 2005). A interação parasito-hospedeiro mediada pelas adesinas é do tipo ligante-receptor, no entanto, até o momento nenhum receptor nas CEVs para as adesinas foi identificado. Entretanto, foi demonstrado que a AP65 e, provavelmente as outras adesinas, podem ser secretadas antes da ligação do parasito. Conforme o modelo proposto, a AP65 é secretada no meio extracelular e liga-se como um monômero ou dímero a um sítio específico na superfície do parasito. Na forma dimérica a AP65 possui uma extremidade N-terminal livre que se liga no sítio específico de ligação na superfície das CEVs (GARCIA e ALDERETE, 2007). O parasito pode utilizar componentes da matriz extracelular e membrana basal, como fibronectina e laminina, para o estabelecimento da colonização e infecção persistente como demonstrado por Crouch e Alderete (1999). Considerando a indução da expressão de genes que codificam a fibronectina, a qual medeia a interação dos parasitos às CEVs, pode-se considerar esse mecanismo como uma via alternativa às adesinas para a colonização do epitélio vaginal (KUCKNOOR *et al.*, 2005).

Funções importantes na patogenicidade do *T. vaginalis* são desempenhadas por mecanismos independentes de contato. Durante o estabelecimento da infecção o *T. vaginalis* promove uma elevação do pH vaginal o que é acompanhado de uma redução dos *Lactobacillus acidophilus*, flora normal vaginal, e aumento de bactérias anaeróbicas. Assim, a interação entre o parasito e a flora vaginal normal pode ser considerada como um passo importante no sucesso da colonização (MC GRORY *et al.*, 1994). Além disso, produtos secretados e liberados pelo *T. vaginalis*, como glicosidases e CDF (do inglês, *Cell-Detaching Factor*), são altamente citotóxicos às CEVs. A severidade dos sintomas e sinais da tricomonose pode ser relacionada com os níveis de CDF, demonstrando a importância deste na patogenicidade da tricomonose (MACIEL *et al.*, 2004).

Após atingir o sucesso em colonizar a mucosa vaginal, o parasito é capaz de sobreviver durante muito tempo neste ambiente hostil, tipicamente ácido e repleto de fatores imunes microbicidas. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa

contra patógenos da mucosa vaginal como *T. vaginalis*, atuando através da indução de citocinas pró-inflamatórias e fatores antimicrobianos, e via estimulação da resposta imune adaptativa (CAUCI e CULHANE, 2007). Além disso, o *T. vaginalis* possui a superfície celular recoberta pelo lipofosfoglicano (LPG), um glicoconjugado abundante, que facilita a adesão através da ligação carboidrato-dependente às galectinas, as quais são proteínas presentes nas CEVs (OKUMURA *et al.*, 2008). Após a ligação às galectinas, o LPG provoca uma resposta inflamatória específica e um aumento da expressão de quimiocinas, tais como interleucina (IL) 8, leucotrieno B4 (RYU *et al.*, 2004; KUCKNOOR *et al.*, 2007) e proteína inflamatória 3 α de macrófagos (FICHOROVA, 2009). A IL-8 é um importante quimioatraente para neutrófilos e macrófagos, sendo capaz de induzir a ativação e degranulação de neutrófilos. Os neutrófilos são as principais células inflamatórias encontradas na secreção vaginal de pacientes com tricomonose. O parasito estimula a produção de IL-8 em neutrófilos, dessa forma, observa-se um maior recrutamento dessas células para o sítio de inflamação, com conseqüente produção de mais IL-8, resultando na exacerbação da inflamação. Por outro lado, o parasito induz a apoptose em neutrófilos, resultando no aumento da produção de IL-10 e diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-6, reduzindo a resposta inflamatória (AHN *et al.*, 2008). Outro composto envolvido na resposta imune inata frente à infecção por *T. vaginalis* é o óxido nítrico (NO), o qual é produzido em diversos tipos celulares. Várias funções imunes são realizadas por este composto: indutor ou supressor da apoptose, imunoregulador e agente tóxico contra microrganismos patogênicos (COLEMAN, 2001). Na tricomonose, o NO, principalmente produzido pelos macrófagos, é citotóxico ao parasito, além de promover a liberação de citocinas e ativar moléculas de adesão (HAN *et al.*, 2009).

Apesar da imunidade inata desempenhar papel de destaque na defesa contra *T. vaginalis*, a resposta imune adaptativa também exerce sua função na tentativa de eliminar este patógeno de mucosa vaginal. Estudos demonstraram a presença de imunoglobulinas (Ig) A e G em secreções vaginais de mulheres com tricomonose aguda (YADAV *et al.*, 2005). IgE somente é encontrada em baixas concentrações no trato genital (ACKERS, 1990). Em homens, IgG e IgM detectadas podem estar relacionadas à tricomonose sintomática quando comparada à assintomática (IMAM *et al.*, 2007). Na maioria dos casos de tricomonose, imunoglobulinas também são

encontradas no soro. No entanto, todos os anticorpos produzidos e/ou secretados durante a tricomonose induzem uma proteção limitada ao hospedeiro, a qual após a erradicação da infecção mediante tratamento decai progressivamente. Num período de seis a doze meses após a infecção, anticorpos específicos a *T. vaginalis* e células B de memória não são encontrados na circulação, deixando o hospedeiro sem defesa contra uma possível reinfecção (CUDMORE *et al.*, 2004). Os baixos níveis de resposta humoral encontrados na tricomonose podem ser devidos a uma interação não invasiva entre o parasito e o hospedeiro humano (PAINTLIA *et al.*, 2002).

Após a adesão, o parasito lança mão de diversos mecanismos de escape da resposta imune do hospedeiro através de (i) secreção de proteases que degradam imunoglobulinas, a porção C3 do complemento, o qual é bastante citotóxico ao parasito e leva à redução do número de trofozoítos (ALDERETE *et al.*, 1995b); (ii) revestimento da superfície dos parasitos com proteínas e macromoléculas do hospedeiro, evitando assim, o reconhecimento pelo sistema imune (PETERSON e ALDERETE, 1982); (iii) variação fenotípica onde ocorre a alternância da expressão de antígenos na superfície, como por exemplo, a alternância da expressão da glicoproteína de superfície altamente imunogênica P270 (ALDERETE, 1999) e; (iv) dramática transformação morfológica, da forma elipsoide para a forma ameboide, contribuindo para o estabelecimento de um maior contato com as CEVs e ação das adesinas (KUCKNOOR *et al.*, 2005). Os mecanismos e fatores de patogenicidade mencionados anteriormente devem ser rigorosamente regulados e fatores ambientais, como o ferro, desempenham um papel fundamental nessa regulação.

I.2.2 Ferro

Todos os organismos vivos, desde os mais primitivos até os mais complexos, requerem o ferro para muitas funções biológicas: transporte de oxigênio, síntese de DNA e RNA, transporte de elétrons e reações metabólicas chaves. Apesar do papel crucial na fisiologia celular, este cátion pode reagir com o oxigênio e produzir espécies reativas que causam danos oxidativos a proteínas, lipídeos e ácido nucléicos (WILSON e BRITIGAN, 1998; TORRES-ROMERO e ARROYO, 2009). Assim, a manutenção da homeostasia do ferro é necessária para alcançar um

balanço entre as concentrações requeridas para a sobrevivência e as tóxicas. Nos hospedeiros mamíferos a rigorosa regulação das concentrações de ferro representa um importante obstáculo para os patógenos, os quais necessitam deste cátion para sua sobrevivência e virulência. Estes microrganismos desenvolveram mecanismos para driblar obstáculos e adquirir ferro a partir de seus hospedeiros. Bactérias, como *Pseudomonas*, utilizam um sistema transportador dependente de sideróforos (moléculas secretadas com elevada afinidade pelo ferro), que competem com a transferrina e outras proteínas do hospedeiro pelo Fe^{3+} , sequestram e internalizam o ferro para suprir suas necessidades (CORNELIS 2010; CROSA e WALSH, 2002). O ferro é essencial para o crescimento *in vitro* de protozoários do gênero *Entamoeba*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Naegleria*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, *Tritrichomonas* e *Trichomonas*. Em parasitos intracelulares como *Plasmodium* e *Leishmania* o grupamento heme proveniente da quebra da hemoglobina pode ser utilizado como fonte de ferro (WILSON e BRITIGAN, 1998). Recentemente foi demonstrado que o parasito *Leishmania amazonensis* adquire ferro através de um transportador localizado na membrana com preferência pelo Fe^{2+} (HUYNH e ANDREWS, 2008). A obtenção de ferro no parasito do trato urogenital bovino, *Tritrichomonas foetus*, ocorre via ferritina e lactoferrina, obtendo Fe^{2+} que é internalizado através de transportadores de membrana (TACHEZY *et al.*, 1996).

O *T. vaginalis*, como os outros patógenos, requer ferro para o crescimento e multiplicação, no entanto, possui uma notória necessidade por este metal, enquanto bactérias necessitam cerca de $0,2 \mu\text{M}$ de ferro, o *T. vaginalis* requer até $300 \mu\text{M}$. Durante a colonização, a principal fonte é o ferro oriundo da lactoferrina. Uma vez estabelecida a infecção, fatores citolíticos elaborados pelo parasito danificam as células epiteliais e eritrócitos disponíveis e podem fornecer ferro suficiente para o crescimento e regulação dos fatores de virulência. Desta forma, o parasito desenvolveu múltiplos sistemas de aquisição de ferro, como a presença de um receptor de ligação com a holo-lactoferrina do hospedeiro e receptores para hemoglobina, hemina, heme e adesinas dos eritrócitos e células epiteliais (LEHKER *et al.*, 1991; MORENO-BRITO *et al.*, 2005; ARDALAN *et al.*, 2009), os quais serão expressos conforme a fonte de ferro disponível, permitindo a rápida adaptação do parasito às constantes mudanças do sítio de infecção.

Neste contexto, o ferro exerce um papel fundamental na modulação da patogenicidade do *T. vaginalis*, pois regula a transcrição ou a função de vários genes e proteínas envolvidas na adesão, citotoxicidade, virulência e estrutura celular. Corroborando com este fato, os sintomas da tricomonose são pronunciados no período pós-menstrual, no qual o parasito adquire o ferro a partir dos eritrócitos disponíveis (PETRIN *et al.*, 1998).

Na presença de ferro a citoaderência é estimulada através do aumento da transcrição e síntese das adesinas, AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23. Além disso, o ferro modula a compartimentalização das mesmas, pois em condições ricas em ferro, as adesinas são expressas na superfície celular, diferente da habitual localização hidrogenossomal. Assim, em situações de privação de ferro o parasito é incapaz de expressar as adesinas na superfície, dificultando a adesão às CEVs (GARCIA *et al.*, 2003; MORENO-BRITO *et al.*, 2005). Alternativamente à adesão mediada pelas adesinas, o parasito pode ligar-se a proteínas da matriz extracelular e membrana basal, como fibronectina e lamina, estabelecendo a infecção. Em um microambiente restrito em ferro, observa-se um aumento da ligação do parasito à fibronectina, o que é importante para a manutenção do parasitismo (CROUCH *et al.*, 2001).

Ademais, o ferro modula a resistência à lise através do aumento da expressão de proteases envolvidas na degradação da porção C3 do sistema complemento. Naturalmente, o parasito vive na vagina, um local hostil com constantes mudanças, principalmente afetadas pelo ciclo menstrual. O parasito entra em contato com proteínas, eritrócitos e sistema complemento, este último, bastante citotóxico ao *T. vaginalis*, levando à lise dos parasitos através de uma via alternativa sem a presença de anticorpos. Apesar do sangue menstrual conter elevada quantidade de sistema complemento, o que leva à redução do número de trofozoítos, também possui grande concentração de ferro, importante fator de resistência a este sistema, que aumenta a expressão de proteases que degradam o complemento e assim, favorecem o parasitismo (ALDERETE *et al.*, 1995b). O parasito é rico em proteases, principalmente, cisteíno proteases (CP) que estão envolvidas em inúmeras propriedades de virulência. Entretanto, ocorre também a regulação negativa de fatores de virulência do *T. vaginalis* na presença do ferro, como a CP65 que em

condições de elevados níveis de ferro tem expressão e atividade proteolítica diminuídas, reduzindo a citotoxicidade (ALVAREZ-SANCHEZ *et al.*, 2007). O ferro também modula a localização na superfície celular e fosforilação do imunógeno P270, o qual desencadeia a variação fenotípica como um mecanismo do parasito de evasão do sistema imune do hospedeiro. Estudos demonstraram que o ferro também influencia a atividade de enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares como ATP, ADP e AMP (TASCA *et al.*, 2005; DE JESUS *et al.*, 2006).

I.3 Sistema purinérgico

O ATP foi primeiramente reconhecido pela sua importância intracelular em muitos processos bioquímicos, como por exemplo, no metabolismo energético (NELSON e COX, 2005). No entanto, além das conhecidas inúmeras funções intracelulares, o ATP apresenta funções extracelulares, como modulação da função cardíaca, fluxo sanguíneo, secreção, inflamação e reações imunes (ROBSON *et al.*, 2006).

Na década de 70, Geoffrey Burnstock propôs a existência de um terceiro sistema de sinalização no sistema nervoso autônomo, além do adrenérgico e colinérgico, o qual foi denominado de purinérgico (BURNSTOCK, 1972). Na sinalização purinérgica estão envolvidos nucleotídeos como o ATP, que atua como molécula sinalizadora via receptores específicos, denominados de purinoceptores (BURNSTOCK, 1976). Uma vez no meio extracelular, os nucleotídeos são degradados enzimaticamente pelas ectonucleotidases (ZIMMERMANN, 2001), produzindo uma série de nucleosídeos, que por sua vez, também exercem ação sinalizadora.

Os receptores purinérgicos foram primeiramente descritos em 1976 e pouco tempo depois, foram distinguidos dois tipos de receptores, identificados como P1 e P2 (Figura 2) (BURNSTOCK e KNIGHT, 2004).

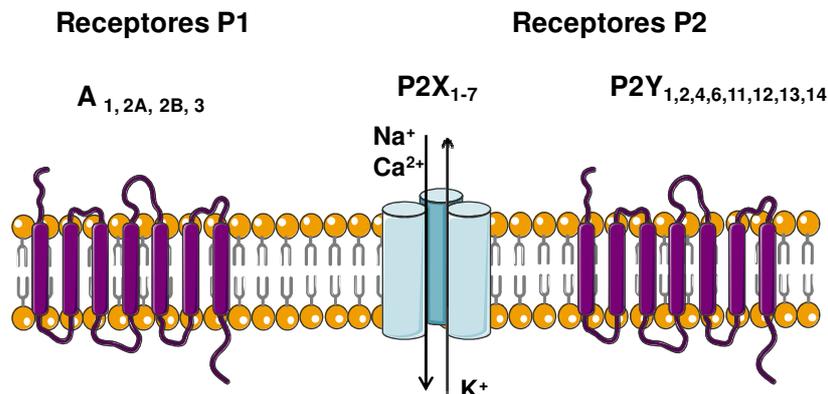


Figura 2. Representação esquemática dos purinoceptores. Receptores P1 acoplados a proteínas G. Os receptores P2 são divididos em duas subfamílias, P2X, os quais estão ligados a canais iônicos, enquanto os receptores P2Y estão acoplados a proteínas G.

Os receptores P1 reconhecem preferencialmente adenosina e são identificados quatro subtipos, A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, todos acoplados a proteínas G. A ação destes receptores pode ser inibitória ou estimulatória (FREDHOLM *et al.*, 2011). Com base em diferenças na estrutura molecular e mecanismos de tradução de sinais, os receptores P2 foram divididos em duas subfamílias de receptores, P2X e P2Y (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998). Até o momento, já foram clonados, caracterizados e aceitos como membros da família de receptores P2 sete membros do subtipo P2X (P2X₁₋₇) e pelo menos oito membros do subtipo P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄). Os primeiros estão ligados a canais iônicos, sendo permeáveis a cátions como Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ e respondem ao ATP. Os segundos são receptores acoplados a proteínas G e respondem em adição ao ATP, a nucleotídeos como ADP, UTP, UDP e ITP (BURNSTOCK e KNIGHT, 2004). Inúmeras células do sistema imunológico expressam receptores de purinas, as quais através dos efeitos extracelulares modulam a resposta imune.

I.3.1 ATP e adenosina – moléculas sinalizadoras endógenas

A concentração de ATP no meio intracelular é elevada, cerca de 3 - 10 mM, enquanto os níveis de ATP encontrados no meio extracelular são baixíssimos (400 - 700 nM). Igualmente ao ATP, os níveis de adenosina extracelular são cerca de 10 vezes menores do que os intracelulares. No entanto, as concentrações extracelulares de ATP e adenosina podem aumentar significativamente em várias condições como inflamação, injúria tecidual e presença de patógenos exógenos.

O ATP e outros nucleotídeos extracelulares podem atuar como DAMPs (do inglês, *damage-associated molecular patterns*), pois contribuem para a inflamação e resposta imune agindo sobre múltiplos tipos celulares imunológicos como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos. Primeiramente, o ATP atua como mediador imunoestimulatório e inflamatório, pois ao sinal de dano celular o ATP intracelular é liberado para o meio extracelular, marca a região danificada e contribui para a inflamação e iniciação da resposta imune primária. Via ativação de receptores P2X₇, o ATP induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-2, IL-12, IL-18 e TNF α , resultando na resposta inflamatória. Nesse momento, ocorre também o recrutamento de leucócitos, ativação de macrófagos, proliferação e ativação de linfócitos. Nos neutrófilos, a primeira linha de defesa contra patógenos, o ATP extracelular aumenta a adesão às células endoteliais, a ação bactericida através da estimulação da degranulação e produção de espécies reativas de oxigênio e retarda a apoptose dos neutrófilos, aumentando o tempo de meia vida destas células. O ATP apresenta um papel pró-inflamatório, em contraste à ação anti-inflamatória da adenosina extracelular. A superativação do sistema imune resulta em inflamação crônica e descontrolada, levando ao dano das células saudáveis. Nesse sentido, a resposta imune e inflamação devem ser rigorosamente reguladas, papel que pode ser desempenhado pelo ATP e adenosina extracelulares, através de um sistema de *feedback* purinérgico, onde os receptores purinérgicos e as ecto-enzimas são componentes cruciais, regulando os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos. Por fim, a adenosina extracelular atua como um importante imunossupressor, pois age como uma molécula sinalizadora de perigo em situações onde se observa uma ativação excessiva da resposta imune e inflamação. Os efeitos da adenosina são mediados pelos receptores P1, resultando na desativação dos macrófagos, supressão da

proliferação e funções efetoras dos linfócitos e regeneração dos tecidos (HASKÓ e CRONSTEIN, 2004; DI VIRGILIO, 2005; BOURS *et al.*, 2006).

I.3.2 Ectonucleotidasas

Os nucleotídeos extracelulares são degradados pela ação de uma série de enzimas localizadas na superfície celular, resultando na formação de nucleosídeos e fosfato livre. Estas enzimas são membros de distintas famílias, no entanto, compartilham algumas características como o sítio catalítico voltado para o meio extracelular ou para o lúmen de organelas; na maioria das vezes estão ligadas à membrana plasmática ou de organelas como complexo de Golgi ou lisossomos, porém isoformas extracelulares clivadas e secretadas podem ser encontradas. A atividade catalítica máxima depende de condições do ambiente como presença de cátions divalentes (cálcio ou magnésio) e pH levemente alcalino. Os valores de K_M , na maioria dos casos, estão na faixa micromolar (ZIMMERMANN, 2000).

Os vários membros das famílias de ectonucleotidasas podem contribuir para a degradação de nucleotídeos, ocorrendo a sobreposição da distribuição tecidual e especificidade aos substratos (Figura 3). Nesse sentido, nucleosídeos di- e trifosfatados podem ser hidrolisados por membros das famílias E-NTPDase (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase - EC 3.6.1.5), E-NPP (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase – EC 3.1.4.1) e fosfatases alcalinas; enquanto a ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) e fosfatases degradam nucleosídeos monofosfatados (ZIMMERMANN, 2001). Muitos estudos revelaram várias funções atribuídas a estas enzimas (ROBSON *et al.*, 2006; SANSOM *et al.*, 2008); no entanto, o principal papel funcional destas está baseado no término da sinalização por nucleotídeos, seguido pela recaptação de purinas (ZIMMERMANN, 2000).

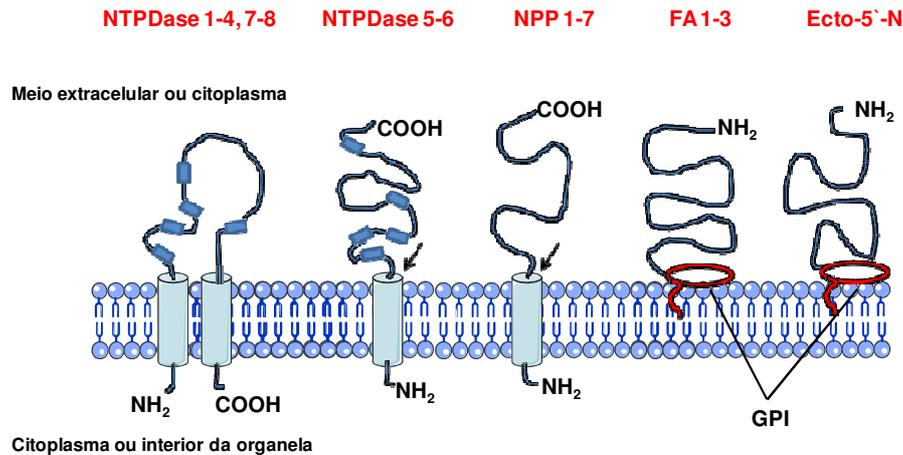


Figura 3. Representação esquemática da topografia das ectonucleotidases. As NTPDases 1-4, 7-8 estão ancoradas à membrana através de dois domínios transmembrana, N- e C-terminal. As NTPDases 5 e 6 possuem apenas um domínio transmembrana, C-terminal, as quais podem ser secretadas após clivagem (seta preta). As cinco regiões conservadas da apirase (ACRs) são representadas pelos retângulos azuis. Os membros da família NPP são proteínas de membrana que podem ser clivadas dando origem a uma forma solúvel. A ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-N) e as fosfatases alcalinas (FA) estão ancoradas à membrana plasmática por glicosilfosfatidil inositol (GPI) podendo ser clivadas.

I.3.2.1 Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase)

A família E-NTPDase é constituída por oito membros já caracterizados e clonados em mamíferos que catalisam a hidrólise de γ - e/ou β -fosfato dos nucleotídeos levando à formação dos respectivos nucleosídeos e fosfato livre (ZIMMERMANN, 2001; BIGONNESSE *et al.*, 2004). Além disso, NTPDases também já foram encontradas em outros vertebrados, invertebrados, plantas, fungos e protozoários (HANDA e GUIDOTTI, 1996; VASCONCELOS *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 1997; ZIMMERMANN, 2001).

Dentre a família E-NTPDase, quatro membros estão tipicamente localizados na superfície celular, as NTPDases 1, 2, 3 e 8. Estas enzimas compartilham algumas características, como a topografia de membrana com dois domínios transmembrana próximos à região N- e C-terminal e a exigência de Ca^{2+} e Mg^{2+} para atividade máxima. Os sítios catalíticos estão voltados para o meio extracelular e hidrolisam tanto purinas como pirimidinas. No entanto, possuem diferenças substanciais na especificidade pelo substrato. A NTPDase 1 (CD39) hidrolisa igualmente bem ATP e

ADP, enquanto a NTPDase 2 (CL39L1) hidrolisa 30 vezes mais ATP do que ADP. A NTPDase 3 (CD30L3) e 8 demonstram uma preferência intermediária pelo ATP, pois possuem uma razão de hidrólise de 3:1 e 2:1, respectivamente. Embora dividam características estruturais com as NTPDases 1, 2, 3 e 8, as NTPDases 4 (LALP70) e 7 (LALP1) apresentam uma localização distinta. Estas enzimas estão localizadas intracelularmente ligadas à membrana de organelas como complexo de Golgi, vacúolo lisossomal/autofágico e retículo endoplasmático. Além disso, ambas hidrolisam nucleotídeos di- e trifosfatados, com maior preferência por UTP e UDP. Diferentemente, as NTPDases 5 (CD39L4) e 6 (CD39L2) possuem apenas um domínio transmembrana na região N-terminal. Estas enzimas catalisam, preferencialmente, a hidrólise de nucleotídeos difosfatados, localizam-se intracelularmente e permitem a secreção da forma solúvel após clivagem proteolítica. Provavelmente, as diferenças nas propriedades catalíticas observadas entre os subtipos de NTPDase são devidas a diferenças na sequência e estrutura das enzimas (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON *et al.*, 2006).

I.3.2.1.1 Propriedades estruturais

A característica comum entre todas as NTPDases são as cinco regiões curtas altamente conservadas da apirase – ACRs (do inglês *apyrase conserved regions*), denominadas de ACR1 a ACR5, cujo comprimento varia de 4 a 13 resíduos de aminoácidos. As ACRs são homólogas aos domínios de ligação de γ - e β -fosfato de membros da superfamília da actina /HSP70/cinase, sugerindo que estes domínios podem desempenhar papéis chave na ligação e hidrólise do nucleotídeo (ZIMMERMANN, 2001). A hipótese de que as ACRs estão envolvidas no processo de catálise, é baseada em experimentos de mutagênese e deleções, que demonstram a alteração da atividade de hidrólise quando, por exemplo, resíduos de histidina são substituídos por resíduos de glicina ou serina na ACR1, verificando-se que a atividade de ATPase é convertida em ADPase (GRINTHAL e GUIDOTTI, 2000). Desta forma, é plausível que pequenas alterações na estrutura terciária da enzima bem como alterações específicas na sequência de aminoácidos podem contribuir para as diferenças na preferência pelo substrato entre os distintos membros da família NTPDase. As NTPDases possuem dois domínios principais que

se dobram formando uma cavidade onde ocorre a ligação do substrato (Figura 4). Além disso, são proteínas integrais de membrana tetraméricas não covalentes, cuja atividade catalítica é diminuída quando ocorre dissociação em monômeros. Igualmente a outras proteínas extracelulares, as NTPDases possuem pontes dissulfeto, as quais estão associadas à estabilização da estrutura terciária e quaternária. Nas E-NTPDases são encontrados dez resíduos de cisteína conservados, provavelmente, resultando em cinco pontes dissulfeto, que auxiliam na manutenção da oligomerização da enzima, a qual quando quebrada, pode afetar as propriedades catalíticas da enzima.

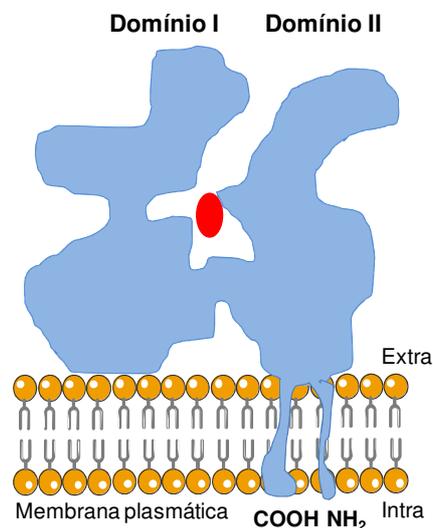


Figura 4. Topografia de membrana da E-NTPDase com dois domínios transmembrana, um na região N- e outro na região C-terminal. A organização dos dois domínios principais forma uma cavidade, onde o substrato, por exemplo, ATP (símbolo em vermelho) se liga e mudanças conformacionais podem ocorrer envolvendo o movimento de cada domínio em relação ao outro.

As NTPDases 1-4, 7 e 8 estão firmemente ancoradas à membrana celular ou de organelas através de dois domínios transmembrana com sequências intracitoplasmáticas curtas em ambas as extremidades (N- e C-terminal). Estes domínios transmembrana interagem entre si e entre os monômeros, podendo causar mudanças conformacionais nos domínios maiores (domínios I e II - Figura 4), resultando em movimentos coordenados durante o processo de ligação e hidrólise dos nucleotídeos (ROBSON *et al.*, 2006). Diferentemente, as NTPDases 5 e 6 possuem apenas o domínio transmembrana na região N-terminal, o qual pode ser

clivado e as enzimas secretadas para o meio extracelular como enzimas solúveis (BRAUN *et al.*, 2000; IVANENKOV *et al.*, 2003). Desta forma, alterações nesse conjunto de propriedades estruturais podem afetar a interação das ACRs envolvidas na ligação e hidrólise e, conseqüentemente, impactar na atividade catalítica da enzima. Até o momento, pouco se sabe a respeito da estrutura desta família de enzimas, no entanto, a estrutura cristalográfica da NTPDase de *Legionella pneumophila* (VIVIAN *et al.*, 2010) e de *Rattus norvegicus* (ZEBISCH e STRÄTER, 2008) já foi obtida. Assim, a determinação da estrutura terciária e quaternária da NTPDase de *T. vaginalis* fornecerá dados relevantes para o entendimento dessas interações e elucidação do mecanismo catalítico a nível molecular. Ferramentas de modelagem e dinâmica molecular são úteis e importantes para a caracterização da estrutura tridimensional (3D) de NTPDases de superfície, pois assim como outras proteínas integrais de membrana, as NTPDases ainda não possuem estruturas cristalográficas adequadas.

1.3.2.2 Ecto-5'-nucleotidase

A ecto-5'-nucleotidase, que representa um marcador de maturação de linfócitos T e B, participa da etapa final da cascata enzimática levando à formação de adenosina e fosfato livre, resultantes da hidrólise de AMP. A ecto-5'-nucleotidase apresenta uma ampla distribuição em bactérias, células de plantas e em tecidos de vertebrados, desempenhando uma variedade de funções. É classificada de acordo com sua localização celular e propriedades bioquímicas em quatro grupos: uma enzima ancorada à membrana plasmática via glicosilfosfatidil inositol (GPI) e três formas solúveis – uma de localização extracelular e duas citoplasmáticas (ZIMMERMANN, 1992).

1.3.2.3 NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em *T. vaginalis*

Em *T. vaginalis* e em outros parasitos, atribui-se funções fisiológicas às enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, através da hidrólise de nucleotídeos extracelulares, como o ATP, resultando na formação de adenosina. Considerando

que o *T. vaginalis* não realiza síntese *de novo* de purinas e pirimidinas, a adenosina é recaptada e utilizada para a síntese de nucleotídeos, principalmente para a incorporação em ácidos nucleicos, o que torna o parasito dependente dessa recaptação para a manutenção do seu crescimento (MUNAGALA e WANG, 2003). Além disso, estas enzimas participam de mecanismos do parasito de escape às respostas do hospedeiro, modulando os processos inflamatórios e imunes.

As atividades de NTPDase e ecto-5'-nucleotidase foram caracterizadas em *T. vaginalis*. Foi demonstrada a presença de uma enzima com a capacidade de hidrolisar igualmente bem ATP e ADP, cuja atividade é aumentada pela presença de cátions divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} (MATOS *et al.*, 2001). Investigações no genoma do parasito revelaram a presença de quatro genes que codificam proteínas que contêm regiões similares às ACRs, presente em todas as NTPDases, sugerindo que um ou mais membros desta família de enzimas podem estar presentes no parasito *T. vaginalis* e serem responsáveis pela atividade de NTPDase. Além disso, todas as proteínas codificadas por estes genes apresentam domínios transmembrana na região C-terminal e atividade extracelular, inferindo que estas proteínas estão ancoradas à membrana celular e atuam como ecto-enzimas (TASCA *et al.*, 2004; SANSOM *et al.*, 2008). A enzima ecto-5'-nucleotidase também foi caracterizada em trofozoítos de *T. vaginalis*. Esta enzima possui uma ampla especificidade por substratos monofosfatados e a hidrólise é ativada na presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} , no entanto, não é dependente de cátions divalentes (TASCA *et al.*, 2003).

As enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase podem estar relacionadas à patogenicidade da tricomonose, pois alguns fatores envolvidos nos mecanismos de patogênese afetaram a atividade das enzimas. O carboidrato *D*-galactose, o qual está envolvido na adesão do parasito às células do hospedeiro, aumenta em 90% a atividade da enzima, sugerindo um possível papel da NTPDase na aderência (DE JESUS *et al.*, 2002). Isolados clínicos frescos de *T. vaginalis* podem apresentar heterogeneidade em relação à razão de hidrólise de ATP:ADP e a atividade de hidrólise destes isolados é maior do que em isolados padrões (TASCA *et al.*, 2005). Em adição, os autores verificaram que, em parasitos cultivados em meio rico em ferro, a atividade da ecto-5'-nucleotidase foi aumentada e em níveis baixos de ferro

foi diminuída. Porém, em relação à atividade da NTPDase não se observou um padrão na influência do ferro sob a atividade da enzima. O ferro é um fator externo que modula a expressão e síntese de vários fatores de virulência do *T. vaginalis*, além de aumentar a taxa de crescimento e multiplicação do parasito, sendo essencial para a patogênese da tricomonose. No mesmo estudo, foi verificado que alguns isolados de *T. vaginalis* não apresentam atividade de ecto-5'-nucleotidase, isto é particularmente importante porque os parasitos não realizam síntese *de novo* de nucleotídeos e dependem de rotas de salvação para a síntese de novas purinas e pirimidinas. Além disso, hormônios esteroides, cujas concentrações constantemente se alteram no meio vaginal e influenciam a aquisição de nutrientes e ocorrência de sintomas, são capazes de modular a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase e, assim, contribuir para o complexo cenário do efeito dos hormônios na hidrólise de nucleotídeos e na influência destes na patogenicidade da tricomonose (RÜCKERT *et al.*, 2009; 2010). Condições de limitação de soro bovino, fonte externa de adenosina, ativam as atividades das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, indicando que estas enzimas são recrutadas para produzir adenosina, a qual é recaptada através de rotas de salvação de purinas. Assim, fica clara a importância destas enzimas na produção de adenosina em condições limitantes de nutrientes e a relevância das mesmas no estabelecimento da infecção através da quebra do ATP e produção de adenosina (FRASSON *et al.*, 2011a, no prelo). Em outro estudo, Frasson *et al.*, (2011b, no prelo) demonstraram o envolvimento do sistema purinérgico, especialmente a enzima ecto-5'-nucleotidase, na produção de óxido nítrico (NO) por neutrófilos estimulados por *T vaginalis*. Verificou-se que ATP e ADP não promoveram alterações significativas na produção de NO. No entanto, adenosina e inosina (produto da desaminação da adenosina) reduziram a produção de NO pelos neutrófilos através da ativação do receptor A_{2A}, contribuindo, desta forma, para o parasitismo, visto que o NO exerce efeitos microbicidas. Esses achados contribuem para o entendimento da interação parasito-hospedeiro e imunidade na tricomonose, indicando o envolvimento do sistema purinérgico.

Além disso, considerando a busca por alternativas e novos alvos terapêuticos no tratamento da tricomonose foi demonstrado que alcaloides isolados de plantas de Amaryllidaceae, como licorina e candimina, são capazes de inibir a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase. Assim, sugere-se que os níveis de ATP e

adenosina extracelulares podem ser modulados pelos alcaloides licorina e candimina em *T vaginalis*, aumentando a suscetibilidade do parasito à resposta imune do hospedeiro na presença desses compostos e, assim, tornando-os inibidores das enzimas do parasito (GIORDANI *et al.*, 2010a).

Em decorrência da lise das células epiteliais durante a tricomonose, a concentração de purinas livres na vagina pode alcançar 10 mM, sendo 90% dos nucleotídeos liberados correspondentes ao ATP. A hidrólise de ATP, ADP e AMP extracelulares pela ação da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase é uma estratégia importante para a modulação dos níveis de nucleotídeos no espaço extracelular, protegendo o parasito da ação citolítica do ATP e produzindo adenosina, anti-inflamatória e essencial para o crescimento, favorecendo assim, o estabelecimento da infecção. Ainda, a NTPDase e a ecto-5'-nucleotidase podem ser consideradas marcadores patogênicos para os protozoários, tornando-se possíveis alvos de novas alternativas para o tratamento da tricomonose.

II. Objetivos

Considerando que a tricomonose é um problema de saúde pública; o papel do ferro na patogênese da tricomonose; o papel dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares na inflamação; a presença de ectonucleotidases já caracterizadas em *T. vaginalis*; a necessidade do conhecimento da estrutura da NTPDase; a busca por uma melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro e, a necessidade de investigação de novos alvos terapêuticos para o tratamento da tricomonose, os objetivos gerais deste estudo foram: (i) investigar o efeito do ferro nas enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase e (ii) construir um modelo tridimensional da enzima NTPDase de *T. vaginalis*.

Assim, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Avaliar o efeito do ferro proveniente de sulfato ferroso, hemoglobina e hemina e do quelante bupiridil no crescimento do parasito *T. vaginalis*;
2. Avaliar o dano oxidativo induzido pelas diferentes fontes de ferro (sulfato ferroso, hemoglobina e hemina) ao parasito *T. vaginalis*;
3. Avaliar o efeito do ferro proveniente de sulfato ferroso, hemoglobina e hemina e do quelante bupiridil na atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em trofozoítos de *T. vaginalis*;
4. Investigar o efeito das diferentes fontes de ferro na expressão gênica da enzima NTPDase de *T. vaginalis*;
5. Construir um modelo tridimensional da enzima NTPDase de *T. vaginalis* e juntamente com os dados funcionais correlacionar com o papel da NTPDase na patogênese da tricomonose.

III. Artigos científicos

III.1. CAPÍTULO 1 – Patrícia de Brum Vieira, Nicolás Luiz Feijó Silva, Luiza Wilges Kist, Giovanna Medeiros Tavares de Oliveira, Maurício Reis Bogo, Geraldo Atillio De Carli, Alexandre José Macedo, Tiana Tasca. Iron from hemoglobin and hemin modulates NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in *Trichomonas vaginalis*.

Manuscrito a ser submetido ao periódico *FEMS Microbiology Letters*

Iron from hemoglobin and hemin modulates NTPDase and ecto-5'-nucleotidase

activities in *Trichomonas vaginalis*

Patrícia de Brum Vieira¹, Nicolás Luiz Feijó Silva¹, Luiza Wilges Kist², Giovanna Medeiros Tavares de Oliveira², Maurício Reis Bogo², Geraldo Atillio De Carli³, Alexandre José Macedo⁴, Tiana Tasca¹

Affiliation

¹Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

²Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

³Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

⁴Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Corresponding Author

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

Email: tiana.tasca@ufrgs.br Phone: +55 51 3308 5325 Fax: +55 51 3308 5437

Abstract

Trichomonal vaginitis caused by the flagellate protozoan *Trichomonas vaginalis* is the most frequently non-viral sexually transmitted disease worldwide. The pathogen has been associated with serious health consequences including predisposition to cervical cancer, adverse pregnancy outcomes and infertility. Moreover and concerningly, it acts as co-factor in HIV transmission and acquisition. Pathogenesis in trichomonosis is a complex mechanism and iron plays an important role. Nucleotides such as ATP are released to extracellular medium in infection sites, tissue stress or injury, acting as signaling molecules in inflammation and immune responses. The ectonucleotidases enzymes, NTPDase and ecto-5'-nucleotidase, modulate extracellular nucleotide levels. In this study, the iron effect on growth, nucleotide hydrolysis and NTPDase gene expression in *T. vaginalis* isolates from female and male patients was evaluated. Iron from different sources maintained *T. vaginalis* growth. Importantly, iron from hemoglobin and hemin activated NTPDase activity in isolates from female patients and conversely, inhibited the enzyme activity in isolates from male patients. Iron treatments were not able to alter the NTPDase transcript levels in *T. vaginalis*. In spite of iron induces oxidative damage in all fresh clinical isolates, this damage did not affect the parasite viability. Overall, the present study demonstrates the important role of iron on *T. vaginalis* growth and metabolism. Furthermore, our results reveal a distinct ATP, ADP and AMP hydrolysis profile between isolates from female and male patients influenced by iron from hemoglobin and hemin. Our data indicate the participation of purinergic system in the establishment of trichomonads infection through ATP degradation and adenosine production influenced by iron.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, iron, nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-5'-nucleotidase

III.2. CAPÍTULO 2 – Modelagem molecular da enzima nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) de *Trichomonas vaginalis* – Dados preliminares

Estudo em desenvolvimento no Grupo de Bioinformática Estrutural, localizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em colaboração com o Prof. Dr. Hugo Verli.

Resumo

O protozoário flagelado *Trichomonas vaginalis* é o agente etiológico da doença sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo. O patógeno está associado a sérias consequências em saúde incluindo predisposição ao câncer cervical, complicações na gravidez, partos prematuros e baixo peso de recém-nascidos e infertilidade. Além disso, o parasito atua como um agente facilitador para a aquisição e transmissão do vírus HIV. O fármaco de escolha para o tratamento da tricomonose é o metronidazol, porém crescente número de casos de resistência vem sendo observado. Neste contexto, a investigação de aspectos bioquímicos do parasito é fundamental para o desenvolvimento de novos fármacos, busca de novos alvos terapêuticos e de moléculas com atividade específica contra o parasito. Nucleotídeos como o ATP são liberados para o meio extracelular em situações de estresse ou injúria e infecção, atuando como moléculas sinalizadoras da resposta imune e inflamatória. As enzimas ectonucleotidases, NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, modulam os níveis extracelulares dos nucleotídeos. Em *Trichomonas vaginalis* estas enzimas já foram caracterizadas, porém pouco se sabe acerca das propriedades estruturais das mesmas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi construir um modelo tridimensional da NTPDase de *T. vaginalis* baseado em homologia com a sequência da NTPDase de *Legionella pneumophila* obtida por técnicas cristalográficas. Assim, juntamente com os dados funcionais da enzima pretende-se contribuir para o entendimento do papel da NTPDase no mecanismo de patogenicidade do parasito *T. vaginalis*.

IV. Discussão geral

A tricomonose, infecção causada pelo parasito *T. vaginalis*, é a DST não viral mais comum no mundo e afeta cerca de 174 milhões de pessoas no mundo conforme dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2001). Após colonização do trato urogenital humano, causa vaginite, uretrite e prostatite. Ademais, está associada a inúmeras consequências, como complicações na gravidez, infertilidade, predisposição ao câncer cervical e doença inflamatória pélvica (PETRIN *et al.*, 1998). O parasito atua como co-fator para a aquisição e transmissão do vírus HIV (LEVINE *et al.*, 1998). Contudo, o metronidazol e o tinidazol, ambos 5-nitroimidazóis, são os únicos fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da tricomonose. O metronidazol é o fármaco de escolha na terapêutica, no entanto, efeitos adversos são frequentemente observados. Além disso, a existência de isolados clínicos resistentes aos fármacos é relatada com cerca de 5% dos isolados apresentando resistência (NARCISI e SECOR, 1996). Considerando que 174 milhões de novos casos ocorrem anualmente no mundo, 5% é um número preocupante de casos de resistência. Possivelmente, este número é subestimado, pois muitos casos de isolados de *T. vaginalis* resistentes não são identificados nem relatados. Além disso, não existem outras fontes terapêuticas disponíveis para a tricomonose. Neste cenário, é evidente a necessidade de alternativas para o tratamento desta DST. Assim, uma estratégia é a investigação por novos compostos anti-*T. vaginalis* estruturalmente distintos dos 5-nitroimidazóis e, conseqüentemente, citotóxicos por mecanismos de ação diferenciados como demonstrado por alguns estudos do nosso grupo de pesquisa (GIORDANI *et al.*, 2010b; 2011). Paralelamente, a busca por novos alvos terapêuticos se mostra promissora, sendo uma forma racional de desenvolvimento de novos agentes antiparasitários.

O desenvolvimento racional de novos fármacos geralmente está baseado nas diferenças bioquímicas e fisiológicas entre o agente infeccioso e seu hospedeiro. Assim, o sucesso do cultivo *in vitro* de parasitos de importância na medicina humana e os avanços nas áreas de bioquímica e biologia molecular, celular e estrutural permitem o entendimento da biologia do parasito e identificação de enzimas ou receptores fundamentais para a manutenção da sobrevivência e crescimento do patógeno, fornecendo subsídios para a caracterização de novos alvos terapêuticos. Neste contexto, destaca-se o estudo do metabolismo de organismos patogênicos, cujas células, assim como as células de mamíferos, possuem centenas de rotas

metabólicas cooperando uma com a outra para manutenção da viabilidade e funcionalidade celular (WANG, 1997; PINK *et al.*, 2005). Dessa forma, um alvo terapêutico é considerado ideal quando (i) está presente unicamente no patógeno ou possui características divergentes do hospedeiro; (ii) é essencial para sobrevivência, crescimento e reprodução do organismo; (iii) existe baixo potencial para o desenvolvimento de resistência; (iv) é a enzima limitante em uma rota metabólica e; (v) possui toxicidade seletiva ao parasito (PINK *et al.*, 2005).

O metabolismo de purinas é essencial para todos os organismos vivos, pois os metabólitos são fundamentais para a síntese de ácidos nucleicos, proteínas e outros compostos e participam do processo de obtenção de energia. Além disso, purinas como o ATP e adenosina desempenham importantes funções nos mecanismos de patogenicidade dos parasitos. Em geral, os parasitos não realizam síntese *de novo* de nucleotídeos púricos (EL KOUNI, 2003), dependendo de rotas de salvação para manter seus requerimentos de purinas. Ademais, as enzimas envolvidas na salvação de nucleotídeos púricos em parasitos e em seus hospedeiros distinguem-se entre si, as quais podem ser exploradas como potenciais alvos para o desenvolvimento de agentes antiparasitários. Neste contexto, o estudo do sistema purinérgico de diversos parasitos vem sendo amplamente explorado e demonstra a influência dessa via de sinalização sobre diferentes funções essenciais dos patógenos e para o estabelecimento das infecções (SANSOM *et al.*, 2008).

Na sinalização purinérgica, nucleotídeos como ATP atuam como moléculas sinalizadoras através da ativação de receptores específicos denominados de purinoceptores (BURNSTOCK, 1976). Uma vez no meio extracelular, os nucleotídeos podem ser degradados por uma família de ectonucleotidasas (ZIMMERMANN, 2001), levando à formação de nucleotídeos intermediários e nucleosídeos que, por sua vez, também exercem ação sinalizadora. A investigação do sistema purinérgico em parasitos patogênicos desperta interesse uma vez que contribui para o entendimento de seus aspectos bioquímicos, bem como da relação com o hospedeiro.

Em *T. vaginalis*, o sistema purinérgico desempenha importante papel na sobrevivência dos trofozoítos, pois estes não realizam síntese *de novo* de nucleotídeos púricos e pirimídicos e dependem assim, das vias de salvação

(HEYWORTH *et al.*, 1982; 1984). Além disso, a adenosina é recaptada e utilizada para a síntese de nucleotídeos, assumindo um papel chave no metabolismo das purinas como precursora de todos os nucleotídeos (MUNAGALA e WANG, 2003). A sinalização purinérgica também pode influenciar na infecção, modulando os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares através das ectonucleotidases do parasito e, assim, contribui para a patogênese da tricomonose, visto que essas moléculas sinalizadoras atuam na inflamação e resposta imune. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa já caracterizaram as enzimas NTPDase (MATOS *et al.*, 2001), ecto-5'-nucleotidase (TASCA *et al.*, 2003) e adenosina deaminase (WEIZENMANN *et al.*, 2011) em trofozoítos intactos de *T. vaginalis*, sugerindo que estas enzimas podem participar do desenvolvimento da infecção.

Os resultados aqui apresentados revelam que o ferro modula a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis*, sugerindo um distinto perfil de hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP entre os isolados de pacientes do sexo feminino e masculino, indicando o envolvimento diferenciado destas enzimas na patogenicidade da tricomonose em pacientes do sexo feminino e masculino.

No Capítulo 1 desta dissertação, visando a investigação do efeito do ferro na atividade e expressão das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis*, foram utilizados seis isolados de *T. vaginalis*: dois isolados ATCC – 30236 e 30238; dois isolados clínicos frescos provenientes de pacientes do sexo feminino – TV-LACM1 e TV-LACM2; e dois isolados clínicos frescos provenientes de pacientes do sexo masculino – TV-LACH1 e TV-LACH2. O desenvolvimento do trabalho com seis isolados em paralelo objetiva a comparação do efeito do ferro no perfil enzimático dos isolados obtidos de amostras de pacientes mulheres e homens. Os parasitos foram submetidos a diferentes condições: (i) controle (meio TYM); (ii) quelante (bipiridil – *low-iron*); (iii) sulfato ferroso (*high-iron*); (iv) hemoglobina e; (v) hemina. Na curva cinética de crescimento sob as condições mencionadas, diferenças no perfil de crescimento entre os isolados foram observadas. As condições que forneciam ferro (sulfato ferroso, hemoglobina e hemina) sustentaram o crescimento de todos os isolados, observando-se um pico no número de trofozoítos em 24 h similar ao controle, onde se verificou viabilidade, morfologia íntegra e crescimento normal. No entanto, na condição de *low-iron*, onde o quelante foi adicionado e,

conseqüentemente, o ferro removido, observou-se redução no crescimento dos organismos ATCC e recentemente isolados. Esta redução foi mais pronunciada nos isolados ATCC, demonstrando uma maior sensibilidade à remoção do ferro. Essa diferença não é surpreendente, tendo em vista que os isolados ATCC estão sob cultivo *in vitro* por longos períodos e estão adaptados ao meio de cultivo, onde todos os nutrientes necessários estão prontamente disponíveis. Assim, quando expostos a uma condição adversa, como a remoção de ferro, não são capazes de sustentar seu crescimento. Os isolados clínicos frescos, obtidos recentemente a partir dos sítios naturais de infecção, estão mais adaptados às constantes modificações do microambiente, como por exemplo, constantes oscilações na concentração de ferro. A vagina é um dos sítios mais complexos para colonização, pois mudanças ocorrem constantemente influenciadas pelo ciclo menstrual. Durante o período menstrual, o ferro é obtido dos eritrócitos liberados e, no período pós-menstrual, a lactoferrina é a principal fonte de ferro para o *T. vaginalis*. Além disso, os hormônios estrogênio e progesterona causam flutuações nas concentrações de ferro e outros nutrientes. A adaptabilidade do *T. vaginalis* pode ser explicada pela existência de rotas de tradução de sinais ligadas a mudanças no microambiente, tornando, desta forma, os parasitos aptos a se adaptarem às mudanças do meio através de mecanismos regulatórios transcricionais e pós-transcricionais (LEHKER e ALDERETE, 2000).

Considerando que o ferro, apesar de ser um metal essencial para todos os organismos vivos, pode reagir com o oxigênio, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando dano a proteínas, lipídeos e DNA e, conseqüentemente, podendo levar o organismo à morte, foi investigado se as concentrações de ferro utilizadas nos tratamentos apresentavam citotoxicidade ao parasito. Assim, de forma inesperada, as concentrações de ferro testadas induziram o dano oxidativo em todos os isolados clínicos frescos. Nos isolados ATCC não foi observado dano.

O *T. vaginalis* é um protozoário microaerofílico que possui inúmeras características de organismos anaeróbicos e traços de oxigênio são suficientes para interferir no metabolismo fermentativo do parasito. O *T. vaginalis* suporta concentrações fisiológicas de oxigênio, refletindo a adaptabilidade do parasito às flutuações de oxigênio no sítio de infecção. Medidas da concentração de oxigênio na

vagina indicam que é um ambiente microaerófilico, cuja concentração varia entre 15 - 56 μM (PAGE-SHARP *et al.*, 1996). Entretanto, concentrações elevadas de oxigênio (maiores que 60 μM) são tóxicas ao parasito devido à ausência de mecanismos de proteção adequados para a remoção de EROs formadas (ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio – H_2O_2) (ELLIS *et al.*, 1994). Em *T. vaginalis*, foi demonstrada a presença de três isoformas da enzima superóxido dismutase (SOD), dentre estas, uma isoforma é dependente de ferro, a qual foi localizada no citosol e nos hidrogenossomos. A SOD desempenha um importante papel na detoxificação do ânion superóxido (altamente reativo), convertendo-o em H_2O_2 (menor reatividade) e H_2O (RASOLOSON *et al.*, 2001). No entanto, a catalase, principal enzima envolvida na detoxificação do H_2O_2 , não foi detectada no *T. vaginalis* (PAGE-SHARP *et al.*, 1996), e provavelmente, a sensibilidade do parasito ao oxigênio está associada a ausência desta enzima.

O ferro, proveniente das diferentes fontes de tratamento, ativa a SOD-dependente de ferro, convertendo ânion superóxido em H_2O_2 e H_2O . Porém, pela ausência da catalase o H_2O_2 não é removido e causa dano aos parasitos. A diferença observada entre os isolados clínicos frescos e ATCC, pode ser atribuída à adaptação dos parasitos cultivados *in vitro* por longos períodos em meios com concentrações de oxigênio mais elevadas do que aquelas encontradas no sítio de infecção, assim, os isolados ATCC são mais aptos a reverter os danos provocados pelo oxigênio. No entanto, cabe ressaltar que as concentrações de ferro utilizadas nos tratamentos, embora tenham induzido ao dano oxidativo, não alteram a viabilidade dos parasitos, o que pode ser confirmado através da curva de cinética de crescimento. Como consequência da função normal das células, em todos os sistemas biológicos, EROs são formadas constantemente e as células estão propensas aos efeitos tóxicos do oxigênio e seus produtos. Entretanto, sistemas de detoxificação, como sistemas enzimáticos ou não-enzimáticos, desempenham papéis chave na remoção das EROs, evitando o dano. Porém, quando ocorre o desequilíbrio entre a formação e a remoção dos agentes oxidantes ocorre o dano oxidativo. Todavia, as células e tecidos possuem a capacidade de se adaptar ou de resistir ao dano oxidativo, reparando ou removendo células e moléculas danificadas. Desta forma, sistemas de reparo do dano oxidativo foram desenvolvidos pelos

sistemas biológicos para evitar a morte celular (MARTINDALE e HOLBROOK, 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Após verificar que as concentrações de ferro utilizadas não afetaram a viabilidade dos parasitos, apesar de induzir dano oxidativo, foi investigado o perfil enzimático da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis* influenciado pelo ferro. No presente estudo foi demonstrado que o ferro modula a atividade de hidrólise extracelular de ATP, ADP e AMP nos diferentes isolados de *T. vaginalis* corroborando com estudos previamente realizados (TASCA et al., 2005; DE JESUS et al., 2006). Nos isolados de pacientes do sexo feminino ATCC (30236 e 30238) e clínicos frescos (TV-LACM1 e TV-LACM2) a atividade da enzima NTPDase foi significativamente aumentada nos parasitos tratados com hemoglobina e hemina em comparação com o controle (trofozoítos cultivados em meio TYM). Porém, a hidrólise de AMP foi significativamente reduzida nos isolados ATCC quando estes foram tratados com hemoglobina e hemina. O ferro é um importante fator de virulência do *T. vaginalis* e as enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase participam da patogênese da tricomonose. Além disso, os sintomas da tricomonose são exacerbados logo após o período menstrual, devido à elevada disponibilidade de ferro. Assim, os resultados indicam que nos organismos isolados de pacientes do sexo feminino, tratados com hemoglobina e hemina, a enzima NTPDase está ativada, aumentando a remoção de moléculas sinalizadoras, ATP e ADP, do meio extracelular e escapando dos efeitos citotóxicos das mesmas. Porém, nestes isolados a atividade da ecto-5'-nucleotidase está inibida, diminuindo a produção de adenosina, importante para o metabolismo e molécula anti-inflamatória, a qual poderia favorecer o estabelecimento da infecção nos isolados de *T. vaginalis* provenientes de pacientes do sexo feminino. Assim, nossa hipótese é que os baixos níveis de adenosina conduzam à exacerbação dos sintomas inflamatórios através da excessiva ativação da resposta imune, característicos do período pós-menstrual, no qual hemoglobina e hemina estão disponíveis (Figura 5). O *T. vaginalis* é um parasito de mucosa, não causa invasão tecidual, dessa forma, a imunidade inata é considerada a principal linha de defesa contra o parasito. Entretanto, inúmeras características da resposta imune vaginal à presença do microrganismo não estão bem entendidas e, assim, os fatores exatos que afetam a variação da sintomatologia encontrada na tricomonose ainda não estão bem esclarecidos.

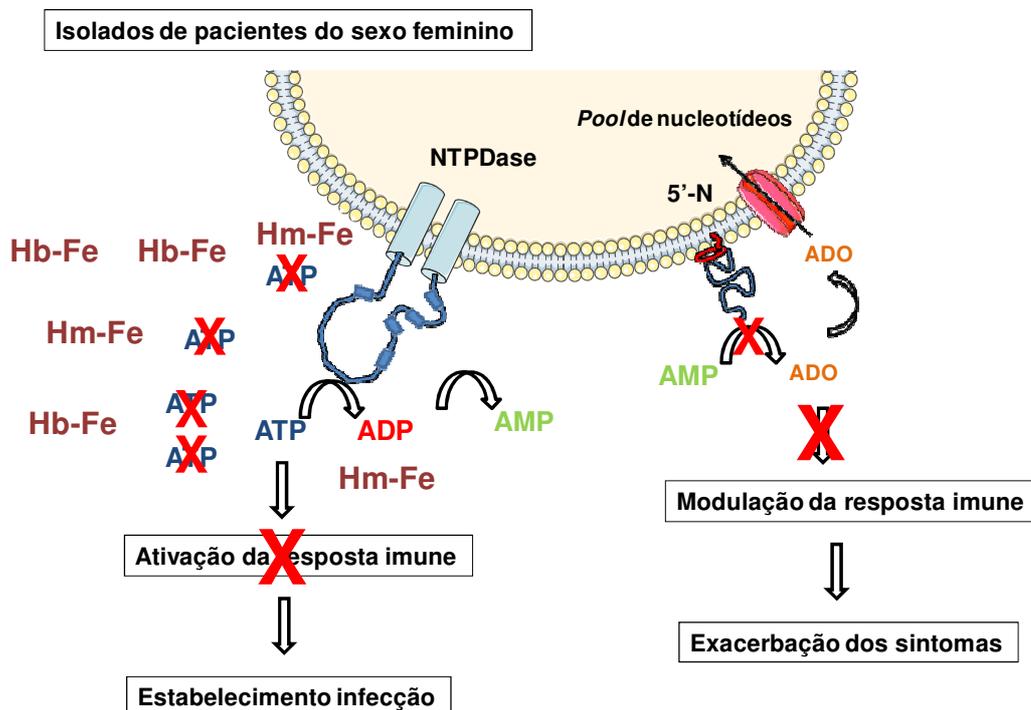


Figura 5. Representação esquemática do efeito do ferro oriundo da hemoglobina (Hb-Fe) e hemina (Hm-Fe) nas enzimas NTPDase (atividade aumentada) e ecto-5'-nucleotidase (atividade reduzida) em isolados de *T. vaginalis* provenientes de pacientes do sexo feminino.

Os isolados clínicos frescos obtidos de pacientes do sexo masculino (TV-LACH1 e TV-LACH2) tratados com hemoglobina e hemina apresentaram uma redução na atividade da enzima NTPDase. Estes achados corroboram com estudos que demonstram que os homens são assintomáticos, provavelmente, pela concentração elevada de zinco no fluido prostático, bem como a ação mecânica que a urina exerce na uretra (KRIEGER e REIN, 1982). Desta forma, o acúmulo de nucleotídeos extracelulares, ATP e ADP, possivelmente conduz à resposta imune eficiente, contribuindo para a remoção dos parasitos do sítio de infecção e protegendo o hospedeiro (Figura 6). Em relação à hidrólise de AMP nos isolados de pacientes do sexo masculino, os organismos tratados com quelante (condição *low-iron*) demonstraram um aumento na atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase. A uretra é um local com baixa disponibilidade de ferro e as células epiteliais são as principais fontes deste metal para os parasitos. Assim, o aumento na hidrólise de AMP pode ser explicado pelo requerimento de adenosina, garantindo duas vantagens ao parasito (i) recaptação da adenosina necessária para a sobrevivência

do parasito, principalmente no ambiente restrito em ferro, como a condição *in vitro* e na uretra, e (ii) produção de adenosina anti-inflamatória para atenuar a resposta imune do hospedeiro.

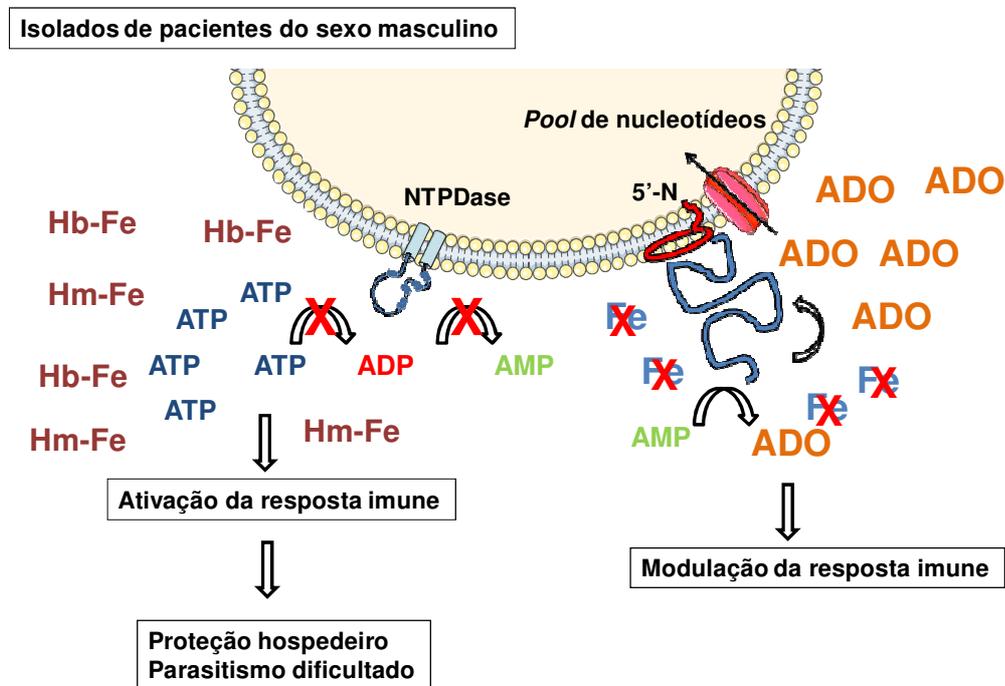


Figura 6. Representação esquemática do efeito do ferro oriundo da hemoglobina (Hb-Fe) e hemina (Hm-Fe) e quelante (remoção do ferro do meio) nas enzimas NTPDase (atividade reduzida) e ecto-5'-nucleotidase (atividade aumentada) em isolados de *T. vaginalis* provenientes de pacientes do sexo masculino.

Na presença de reação inflamatória, injúria tecidual e patógenos, o ATP extracelular pode agir como uma molécula sinalizadora de perigo, induzindo a resposta imune e inflamação. Durante a tricomonose, devido à descamação e lise das células epiteliais vaginais, a concentração de purinas pode atingir 10 mM, sendo que 90% dos nucleotídeos liberados na vagina são ATP (MUNAGALA e WANG, 2003). Considerando os níveis elevados de nucleotídeos extracelulares, a atividade da NTPDase de *T. vaginalis* é essencial para a sobrevivência do parasito em um ambiente hostil e sob constantes alterações, através da modulação dos níveis de ATP extracelular e proteção contra os efeitos citotóxicos do mesmo. O tratamento com hemoglobina e hemina, fontes naturais de ferro para o parasito, ativou a NTPDase em isolados de pacientes do sexo feminino (frescos ou ATCC), enquanto, que nos isolados de pacientes do sexo masculino a enzima foi inibida. Estes resultados revelam a importância do ferro na patogênese da tricomonose, através do aumento da degradação do ATP extracelular, contribuindo para o escape do parasito

da resposta imune do hospedeiro. Além disso, estes achados permitem traçar um perfil de hidrólise de ATP e ADP distinto entre os isolados de pacientes do sexo feminino (frescos ou ATCC) e masculinos. Nos isolados de pacientes do sexo feminino, o ferro oriundo da hemoglobina e hemina ativaram a NTPDase, enquanto, nos isolados de pacientes do sexo masculino, as mesmas fontes de ferro inibiram a enzima, indicando que nos isolados do sexo feminino o ferro, disponível no sítio natural de infecção, favorece o parasitismo.

A enzima ecto-5'-nucleotidase é o membro da cascata enzimática responsável pela produção de adenosina. Neste estudo, isolados de *T. vaginalis* apresentaram muito baixa ou nenhuma atividade da ecto-5'-nucleotidase. Este fato é bastante intrigante, pois o parasito não realiza síntese *de novo* de nucleotídeos e dependente de rotas de salvação para gerar nucleotídeos (HEYWORTH *et al.*, 1982; 1984). Além disso, a adenosina é considerada o precursor primário do *pool* de nucleotídeos púricos em *T. vaginalis* (MUNAGALA e WANG, 2003). Portanto, a ecto-5'-nucleotidase é essencial para a produção de adenosina e guanossina requeridos pelo parasito. Neste estudo, os isolados clínicos frescos de pacientes do sexo feminino, TV-LACM1 e TV-LACM2, não apresentaram atividade de ecto-5'-nucleotidase, mesmo em condições de cultivo ricas em ferro. A ausência da hidrólise de AMP pode resultar em importantes consequências para ambos hospedeiro e parasito no curso da infecção. A adenosina é um agente anti-inflamatório que se liga a receptores específicos para regular as consequências da inflamação. Portanto, a falta ou a diminuição da hidrólise de AMP, resultando na diminuição da produção de adenosina, pode resultar na exacerbação dos sintomas devido à excessiva ativação da resposta imune e inflamatória (HASKÓ e CRONSTEIN, 2004; DI VIRGILIO, 2005; BOURS 2006). Nossos resultados vêm de encontro ao observado na clínica, quando os sintomas são exacerbados no período pós-menstrual, visto que a hemoglobina e hemina inibiram a atividade da ecto-5'-nucleotidase nos isolados de pacientes do sexo feminino, reduzindo os níveis de adenosina.

Na tentativa de elucidar o mecanismo pelo qual o ferro exerce seus efeitos sobre as enzimas, foi avaliado o efeito da hemoglobina e hemina na expressão gênica da enzima NTPDase. No entanto, através de análises de RT-PCR foi demonstrado que essas fontes de ferro não afetaram os níveis de transcritos da

NTPDase. Estes resultados divergem dos dados da literatura, onde o ferro modula a expressão gênica de adesinas e proteinases envolvidas na patogênese da tricomonose. Em estudos prévios, foi demonstrado que meios ricos em ferro aumentam os níveis de transcritos da AP65, contribuindo para a adesão do parasito às células epiteliais vaginais (LEHKER *et al.*, 1991; GARCIA *et al.*, 2003; ALDERETE *et al.*, 2004; KUCKNOOR *et al.*, 2005). Em contraste, a expressão gênica da CP65, cisteíno protease envolvida nas propriedades de virulência do *T. vaginalis*, é aumentada em situações de privação de ferro (ALVAREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2007).

No presente estudo não foi investigado o efeito da hemoglobina e da hemina na expressão gênica da ecto-5'-nucleotidase, pois apesar de exaustiva investigação no GenBank Databases, não foi encontrado em *T. vaginalis* qualquer homólogo para esta enzima (CARLTON *et al.*, 2007). Este fato pode ser baseado em duas hipóteses (i) ocorrência de sequências depositadas erroneamente no GenBank e; (ii) atribuição equivocada da função da enzima, representando cerca de 5 a 40% de erros. Além disso, é simplista pensar que toda enzima apresenta apenas uma função e esta promiscuidade aumenta os problemas para a anotação funcional, desde que cada função deve ser qualificada de acordo com o contexto da celular (FURNHAM *et al.*, 2009). Apesar das dificuldades, nosso grupo está empenhado no esclarecimento da expressão gênica da atividade de ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis*.

Considerando que o sistema purinérgico de *T. vaginalis* tem como principal função a regulação dos níveis de nucleotídeos extracelulares, visando o crescimento do parasito e estabelecimento da infecção, os resultados apresentados no Capítulo 1 revelam a importância do ferro, oriundo da hemoglobina e hemina (fontes encontradas no sítio de infecção), na modulação das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, através da degradação de ATP, contribuindo assim, para o sucesso do parasitismo. Desta forma, estas enzimas tornam-se alvos interessantes para o desenvolvimento de novos agentes anti-*T. vaginalis*.

Embora funções importantes sejam atribuídas à NTPDase de *T. vaginalis*, pouco se sabe acerca da estrutura desta enzima. Neste sentido, o objetivo do Capítulo 2 desta dissertação foi construir um modelo tridimensional da NTPDase de *T. vaginalis* e juntamente com os dados funcionais contribuir para o entendimento do

papel desta enzima nos mecanismos de patogenicidade do *T. vaginalis*. Estudos do nosso grupo de pesquisa indicam que a NTPDase está localizada na superfície celular do parasito (MATOS *et al.*, 2001; TASCA *et al.*, 2004). Além disso, quatro genes que codificam proteínas que contêm as cinco regiões da apirase foram encontrados no genoma de *T. vaginalis*, indicando a presença de um ou mais membros da família da NTPDase (SANSOM *et al.*, 2008). A predição da estrutura terciária da NTPDase de *T. vaginalis* foi realizada por modelagem comparativa, utilizando a estrutura cristalográfica da NTPDase de *Legionella pneumophila* como molde (VIVIAN *et al.*, 2010). Os resultados preliminares indicam a presença de duas NTPDases distintas em *T. vaginalis*, as quais apresentam um domínio transmembrana na região C-terminal, as cinco regiões conservadas da apirase e, baseado na análise filogenética, as NTPDases de *T. vaginalis* estão em um mesmo ramo que a NTPDase de *L. pneumophila*, indicando relação evolutiva entre estas enzimas. Sugere-se também uma relação distante entre as NTPDases de *T. vaginalis* e as NTPDases de humano, o que, mais uma vez, contribui para a utilização destas enzimas como potenciais alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da tricomonose. Certamente, a construção de um modelo tridimensional da NTPDase de *T. vaginalis* adequado contribuirá significativamente para o entendimento da função desta enzima na biologia do parasito.

V. Conclusões gerais

Os resultados apresentados nesta dissertação permitem as seguintes conclusões:

1. O ferro oriundo do sulfato ferroso, hemoglobina e hemina sustentaram o crescimento dos seis isolados de *T. vaginalis* testados;

2. Os isolados ATCC 30236 e 30238 apresentaram maior sensibilidade no crescimento na ausência de ferro do que os isolados clínicos frescos;

3. As condições de tratamento avaliadas induziram ao dano oxidativo nos isolados clínicos de pacientes do sexo feminino e masculino. O dano induzido não foi significativo para conduzir os parasitos à morte;

4. Quando incubados na presença de hemoglobina e hemina os isolados de *T. vaginalis* provenientes de pacientes do sexo feminino (frescos e ATCC) demonstraram uma maior atividade de NTPDase (hidrólise de ATP e ADP) do que os isolados obtidos de pacientes do sexo masculino, indicando uma maior eficiência em causar a infecção em mulheres;

5. O tratamento com hemoglobina e hemina não afetaram a expressão gênica das NTPDases de *T. vaginalis*;

6. Quando incubados na presença de hemoglobina e hemina os isolados de *T. vaginalis* provenientes de pacientes do sexo feminino demonstraram redução da atividade de ecto-5'-nucleotidase (hidrólise de AMP), resultando na menor produção de adenosina, contribuindo para a exacerbação dos sintomas. Nos isolados de *T. vaginalis* provenientes de pacientes do sexo masculino observou-se um aumento na atividade de ecto-5'-nucleotidase nos organismos incubados com o quelante, resultando na maior produção de adenosina, garantindo a sobrevivência do parasito;

7. A análise filogenética das NTPDases A e B de *T. vaginalis* indicou uma maior relação evolutiva com a NTPDase de *Legionella pneumophila* do que com as NTPDases de outros organismos avaliados;

8. Ambas as NTPDases de *T. vaginalis* possuem um domínio transmembrana na região C-terminal, indicando diferenças estruturais entre estas enzimas e as NTPDases humanas;

9. Os resultados preliminares indicam que as NTPDases A e B são enzimas distintas;

10. A cascata enzimática presente em *T. vaginalis* composta pelas enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase contribui para os mecanismos de escape do parasito à resposta imune do hospedeiro através da degradação de ATP e produção de adenosina. Desta forma, a NTPDase e a ecto-5'-nucleotidase podem ser consideradas potenciais alvos terapêuticos para o desenvolvimento racional de novos fármacos para o tratamento da tricomonose.

VI. Perspectivas

No sentido de avançar no entendimento acerca da função do sistema purinérgico na patogenicidade da tricomonose, bem como da influência do ferro neste sistema, algumas perspectivas são sugeridas:

1. Investigação do efeito de nucleotídeos/nucleosídeo da adenina na produção de óxido nítrico por neutrófilos estimulados com trofozoítos de *T. vaginalis* submetidos ao tratamento com as diferentes fontes de ferro;
2. Avaliação do envolvimento do sistema purinérgico de *T. vaginalis* tratados com diferentes fontes de ferro na citotoxicidade às células epiteliais vaginais;
3. Determinação da localização estrutural, através de simulações de dinâmica molecular, das regiões conservadas da apirase (ACRs) nos modelos construídos para as NTPDases A e B de *T. vaginalis*;
4. Identificação dos resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com substrato e íons ativadores através de simulações de dinâmica molecular;
5. Realização de simulações com o metal ferro.

VII. Referências

- ACKERS, J. P. Immunologic aspects of human trichomoniasis. In: HONIGBERG, B. M., ed. *Trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York. 1990. p.36-52.
- AHN, M. H.; SONG, H. O.; RYU, J. S. *Trichomonas vaginalis*-induced neutrophil apoptosis causes anti-inflammatory cytokine production by human monocyte-derived macrophages. *Parasite Immunology*, v.30, n.8, p.410-416, 2008.
- ALDERETE, J. F.; ARROYO, R.; LEHKER, M. W. Analysis for adhesins and specific cytoadhesion of *Trichomonas vaginalis*. *Methods in Enzymology*, v.253, p.407-414, 1995a.
- ALDERETE, J. F.; PROVENZANO, D.; LEHKER, M. W. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microbial Pathogenesis*, v.19, p.93-103, 1995b.
- ALDERETE, J. F. The *Trichomonas vaginalis* phenotypically varying P270 immunogen is highly conserved except for numbers of repeated elements. *Microbial Pathogenesis*, v.27, n.2, p.93-104, 1999.
- ALDERETE, J. F.; MILLSAP, K. W.; LEHKER, M. W.; BENCHIMOL, M. Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cellular Microbiology*, v.3, p.359-370, 2001.
- ALDERETE, J. F.; NGUYEN, J.; MUNDODI, V.; LEHKER, M. W. Heme-iron increases levels of AP65-mediated adherence by *Trichomonas vaginalis*. *Microb Pathogenesis*, v.36, p. 263-271, 2004.
- ALI, V.; NOZAKI, T. Current Therapeutics, Their Problems, and Sulfur-Containing-Amino-Acid Metabolism as a Novel Target against Infections by "Amitochondriate" Protozoan Parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, v.20, n.1, p.164-187, 2007.
- ALVAREZ-SÁNCHEZ, M. E.; SOLANO-GONZÁLEZ, E.; YAÑEZ-GÓMEZ, C.; ARROYO, R. Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection*, v.9, n.14-15, p.1597-1605, 2007.

- ARDALAN, S.; CRAIG LEE, B.; GARBER, G. E. *Trichomonas vaginalis*: The adhesins AP51 and AP65 bind heme and hemoglobin. *Experimental Parasitology*, v.121, n.4, p.300-306, 2009.
- ARROYO, R.; ENGBRING, J.; ALDERETE, J. F. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology*, v.6, n.7, p.853-862, 1992.
- BAKARE, R. A.; ASHIRU, J. O.; ADEYEMI-DORO, F. A.; EKWEZOR, C. C.; ONI, A. A.; OKESOLA, A. O.; ADEBAYO, J. A. Non-gonococcal urethritis (NGU) due to *Trichomonas vaginalis* in Ibadan. *West African Journal of Medicine*, v.18, n.1, p.64-68, 1999.
- BEACH, D. H.; HOLZ, J. G. G.; SINGH, B. N.; LINDMARK, D. G. Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.38, p.175-190, 1990.
- BEACH, D. H.; HOLZ JR, G. G.; SINGH, B. N.; LINDMARK, D. G. Phospholipid metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.44, n.1, p.97-108, 1991.
- BENCHIMOL, M. Trichomonads under Microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, v. 10, p. 528-550, 2004.
- BENCHIMOL, M. Hidrogenossomos. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M., ed. *A célula 2001*. Manole, Barueri. 2001. p. 181-186.
- BIGONNESSE, F.; LEVESQUE, S. A.; KUKULSKI, F.; LECKA, J.; ROBSON, S. C.; FERNANDES, M. J.; SÉVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry*, v.43, p.5511-5519, 2004.
- BORST, P.; OUELLETTE, M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annual Review of Microbiology*, v.49, n.1, p.427-460, 1995.
- BOURS, M. J. L.; SWENNEN, E. L. R.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B. N.; DAGNELIE, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, v.112, n.2, p.358-404, 2006.
- BRAUN, N.; FENGLER, S.; EBELING, C.; SERVOS, J.; ZIMMERMANN, H. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a

nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *The Biochemical Journal*, v.35, p.1639 - 647, 2000.

BURNSTOCK, G. Purinergic Nerves. *Pharmacological Reviews*, v.24, n.3, p.509-581, 1972.

BURNSTOCK, G. Purinergic receptors. *Journal of Theoretical Biology*, v.62, n.2, p.491-503, 1976.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. In: KWANG, W. J., ed. *International Review of Cytology*, Vol. Volume 240. Academic Press. 2004. p.31-304.

CARLTON, J. M.; HIRT, R. P.; SILVA, J. C.; DELCHER, A. L.; SCHATZ, M.; ZHAO, Q.; WORTMAN, J. R.; *et al.* Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, v.315, p.207-211, 2007.

CAUCI, S.; CULHANE, J. F. Modulation of vaginal immune response among pregnant women with bacterial vaginosis by *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and yeast. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v.196, n.2, p.133.e1-133.e7, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL & PREVENTION. Trichomoniasis. Disponível em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Trichomoniasis.htm>. Acesso em: 12 de out. 2011.

CHERPES, T. L.; WIESENFELD, H. C.; MELAN, M. A.; KANT, J. A.; COSENTINO, L. A.; MEYN, L. A.; HILLIER, S. L. The Associations between Pelvic Inflammatory Disease, *Trichomonas vaginalis* Infection, and Positive Herpes Simplex Virus Type 2 Serology. *Sexually Transmitted Diseases*, v.33, n.12, p.747-752 10.1097/01.olq.0000218869.52753.c7, 2006.

CORNELIS, P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.86, n.6, p.1637-1645, 2010.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, v.1, n.8, p.1397-1406, 2001.

COTCH, M. F.; PASTOREK II, J. G. N.; NUGENT, R. P.; HILLIER, S. L.; GIBBS, R. S.; MARTIN, D. H.; ESCHENBACH, D. A.; EDELMAN, R.; CAREY, J. C.; REGAN, J. A.; KROHN, M. A.; KLEBANOFF, M. A.; RAO, A. V.; RHOADS, G.

- G. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Sexually Transmitted Diseases*, v.24, p.353-360, 1997.
- CROSA, J. H.; WALSH, C. T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.66, n.2, p.223-249, 2002.
- CROUCH, M.-L.; ALDERETE, J. F. *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin. *Microbiology*, v.145, n.10, p.2835-2843, 1999.
- CROUCH, M.-L.; BENCHIMOL, M.; ALDERETE, J. F. Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* is influenced by iron and calcium. *Microbial Pathogenesis*, v.31, p.131-144, 2001.
- CUDMORE, S. L.; DELGATY, K. L.; HAYWARD-MCCLELLAND, S. F.; PETRIN, D. P.; GARBER, G. E. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.17, n.4, p.783-793, 2004.
- DE JESUS, J. B.; PINHEIRO, A. A. S.; LOPES, A. H. C. S.; MEYER-FERNANDES, J. R. An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, v.57, n.9-10, p.890-6, 2002.
- DE JESUS, J. B.; FERREIRA, M. A.; CUERVO, P.; BRITTO, C.; COSTA E SILVA-FILHO, F.; ROBERTO MEYER-FERNANDES, J. Iron modulates ectophosphohydrolase activities in pathogenic trichomonads. *Parasitology International*, v.55, n.4, p.285-290, 2006.
- DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signalling*, v.1, n.3, p.205-209, 2005.
- EL KOUNI, M. H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacology and Therapeutics*, v.99, n.3, p.283-309, 2003.
- ELLIS, J. E.; YARLETT, N.; COLE, D.; HUMPHREYS, M. J.; LLOYD, D. Antioxidant defences in the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*: comparison of metronidazole-resistant and sensitive strains. *Microbiology*, v.140, n.9, p.2489-2494, 1994.

- ENGBRING, J.; ALDERETE, J. F. Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Molecular Microbiology*, v.28 p.305-313, 1998.
- FICHOROVA, R. N. Impact of *Trichomonas vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *Journal of Reproductive Immunology*, v.83, n.1-2, p.185-189, 2009.
- FRASSON, A. P.; CHARÃO, M. F.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; GARCIA, S. C.; BONORINO, C.; BOGO, M. R.; DE CARLI, G. A.; TASCA, T. Analysis of the NTPDase and ecto-5'-nucleotidase profiles in serum-limited *Trichomonas vaginalis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (no prelo a).
- FRASSON, A. P.; DE CARLI, G. A.; BONAN, C. D.; TASCA, T. Involvement of purinergic signaling on nitric oxide production by neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Purinergic Signaling* (no prelo b).
- FURNHAM, N.; GARAVELLI, J. S.; APWEILER, R.; THORNTON, J. M. Missing in action: enzyme functional annotations in biological databases. *Nature Chemical Biology*, v.5, n.8, p.521-525, 2009.
- FREDHOLM, B. B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K. A.; LINDEN, J.; MÜLLER, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacological Reviews*, v.63, n.1, p.1-34, 2011.
- GARCIA, A. F.; CHANG, T.-H.; BENCHIMOL, M.; KLUMPP, D. J.; LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology*, v.47, n.5, p.1207-1224, 2003.
- GARCIA, A.; ALDERETE, J. F. Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *BMC Microbiology*, v.7, n.1, p.116, 2007.
- GERKEN, T. A. Biophysical Approaches to Salivary Mucin Structure, Conformation and Dynamics. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, v.4, n.3, p.261-270, 1993.
- 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. *Parasitology International*, v.59, n.2, p.226-231, 2010a.
- GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T. Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Natural Products*, v.73, n.12, p.2019-2023, 2010b.
- GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry*, v.72, n.7, p.645-650, 2011.
- GRINTHAL, A.; GUIDOTTI, G. Substitution of His59 converts CD39 apyrase into an ADPase in a quaternary structure dependent manner. *Biochemistry*, v.39, n.1, p.9-16, 2000.
- GRODSTEIN, F.; GOLDMAN, M. B.; CRAMER, D. W. Relation of Tubal Infertility to History of Sexually Transmitted Diseases. *American Journal of Epidemiology*, v.137, n.5, p.577-584, 1993.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press. 2007. 851 p.
- HAN, I. H.; GOO, S. Y.; PARK, S. J.; HWANG, S. J.; KIM, Y. S.; YANG, M. S.; AHN, M. H.; RYU, J. S. Proinflammatory cytokine and nitric oxide production by human macrophages stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *The Korean Journal of Parasitology*, v.47, p.205-212, 2009.
- HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and Cloning of a Soluble ATP-Diphosphohydrolase (Apyrase) from Potato Tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.218, n.3, p.916-923, 1996.
- HASKO, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*, v.25, n.1, p.33-39, 2004.
- HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E.; GINGER, C. D. Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters*, v.141, n.1, p.106-110, 1982.

- HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E.; GINGER, C. D. Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters*, v.176, n.1, p.55-60, 1984.
- HONIGBERG, B. M.; BRUGEROLLE, G. Structure. In: HONIGBERG, B. M., ed. *Trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York. 1990. p.5-35.
- HUYNH, C.; ANDREWS, N. W. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*. *Cellular Microbiology*, v.10, n.2, p.293-300, 2008.
- IMAM, N. F.; EASSA, A. H.; SHOEIB, E. Y.; ABO-RAIA, G. Y. Antibody isotypes in urethral swabs of symptomatic and asymptomatic men infected with *Trichomonas vaginalis*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, v.37, p.977-988, 2007.
- IVANENKOV, V. V.; MURPHY-PIEDMONTE, D. M.; KIRLEY, T. L. Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39L2) nucleotidase: implications for structure and function. *Biochemistry*, v.42, n.40, p.11726-11735, 2003.
- KLEBANOFF, M. A.; CAREY, J. C.; HAUTH, J. C.; HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; THOM, E. A.; ERNEST, J. M.; HEINE, R. P.; WAPNER, R. J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; MODOVNIK, M.; SIBAI, B. M.; DORSTEN, J. P. V.; DOMBROWSKI, M. P.; O'SULLIVAN, M. J.; VARNER, M.; LANGER, O.; MCNELLIS, D.; ROBERTS, J. M.; LEVENO, K. J. Failure of Metronidazole to Prevent Preterm Delivery among Pregnant Women with Asymptomatic *Trichomonas vaginalis* Infection. *New England Journal of Medicine*, v.345, n.7, p.487-493, 2001.
- KRIEGER, J. N.; REIN, M. F. Canine prostatic secretions kill *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, v.37, n.1, p.77-81, 1982
- KUCKNOOR, A. S.; MUNDODI, V.; ALDERETE, J. F. Adherence to Human Vaginal Epithelial Cells Signals for Increased Expression of *Trichomonas vaginalis* Genes. *Infection and Immunity*, v.73, n.10, p.6472-6478, 2005.
- KUCKNOOR, A. S.; MUNDODI, V.; ALDERETE, J. F. The proteins secreted by *Trichomonas vaginalis* and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65. *Cellular Microbiology*, v.9, n.11, p.2586-2597, 2007.
- KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*, v.29, p.199-212, 1999.

- LEHKER, M. W.; ARROYO, R.; ALDERETE, J. F. The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Experimental Medicine*, v.174, p.311-318, 1991.
- LEHKER, M. W.; SWEENEY, D. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sexually Transmitted Infections*, v.75, n.4, p.231-238, 1999.
- LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Biology of trichomonosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.13, n.1, p.37-45, 2000.
- LEVINE, W. C.; POPE, V.; BHOOMKAR, A.; TAMBE, P.; LEWIS, J. S.; ZAIDI, A. A.; FARSHY, C. E.; MITCHELL, S.; TALKINGTON, D. F. Increase in endocervical CD4 lymphocytes among women with nonulcerative sexually transmitted diseases. *Journal of Infectious Diseases*, v.177, n.1, p.167-174, 1998.
- LINDMARK, D. G.; MÜLLER, M. Hydrogenosome, a Cytoplasmic Organelle of the Anaerobic Flagellate *Trichomonas foetus*, and Its Role in Pyruvate Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, v.248, n.22, p.7724-7728, 1973.
- LINSTEAD, D. Cultivation. In: HONIGBERG, B. M., ed. *Trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York. 1990. p.91-111.
- LUMSDEN, W. H.; ROBERTSON, D. H.; HEYWORTH, R.; HARRISON, C. Treatment failure in *Trichomonas vaginalis* vaginitis. *Genitourinary Medicine*, v.64, n.4, p.217-218, 1988.
- MACIEL, G. P.; T., T.; DE CARLI, G. A. Aspectos Clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. *Bras Patol Med Lab*, v.40, n.3, p.152-160, 2004.
- MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, v.192, n.1, p.1-15, 2002.
- MATOS, J. A. M.; BORGES, F. P.; TASCA, T.; BOGO, M. R.; DE CARLI, G. A.; FAUTH, M. G.; DIAS, R. D.; BONAN, C. D. Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology*, v.31, p.770-775, 2001.
- MC CLELLAND, R. S.; SANGARÉ, L.; HASSAN, W. M.; LAVREYS, L.; MANDALIYA, K.; KIARIE, J.; NDINYA-ACHOLA, J.; JAOKO, W.; BAETEN, J. M. Infection

with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *Journal of Infectious Diseases*, v.195, n.5, p.698-702, 2007.

MC GRORY, T.; MEYSICK, K. C.; LEMCHUK-FAVEL, L. T.; GARBER, G. E. The interaction of *Lactobacillus acidophilus* and *Trichomonas vaginalis* in vitro. *The Journal of Parasitology*, v.80, p.50-54, 1994.

MORENO-BRITO, V.; YÁÑEZ-GÓMEZ, C.; MEZA-CERVANTEZ, P.; ÁVILA-GONZÁLEZ, L.; RODRÍGUEZ, M. A.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; ARROYO, R. A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cellular Microbiology*, v.7, n.2, p.245-258, 2005.

MÜLLER, M. Biochemistry of *Trichomonas vaginalis*. In: HONIGBERG, B. M., ed. *Trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York. 1990. p.53-83.

MÜLLER, M. The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology*, v.139, p.2879-2889, 1993.

MUNAGALA, N. R.; WANG, C. C. Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.127, n.2, p.143-149, 2003.

NARCISI, E.; SECOR, W. In vitro effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.40, n.5, p.1121-1125, 1996.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of Bioenergetics. In: NELSON, D. L.; COX, M. M., ed. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York. 2005. p.489-520.

OKUMURA, C. Y. M.; BAUM, L. G.; JOHNSON, P. J. Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cellular Microbiology*, v.10, n.10, p.2078-2090, 2008.

PAGE-SHARP, M.; BEHM, C. A.; SMITH, G. D. *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*: the pattern of inactivation of hydrogenase activity by oxygen and activities of catalase and ascorbate peroxidase. *Microbiology*, v.142, n.1, p.207-211, 1996.

- PAINTLIA, M. K.; KAUR, S.; GUPTA, I.; GANGULY, N. K.; MAHAJAN, R. C.; MALLA, N. Specific IgA response, T-cell subtype and cytokine profile in experimental intravaginal trichomoniasis. *Parasitology Research*, v.88, p.338-343, 2002.
- PETERSON, K. M.; ALDERETE, J. F. Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, v.37, n.2, p.755-762, 1982.
- PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, p.300-317, 1998.
- PINK, R.; HUDSON, A. T.; MOURIES, M.-A.; BENDIG, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.4, n.9, p.727-740, 2005.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacology Reviews*, v.50, p.413-492, 1998.
- RASOLOSON, D.; TOMKOVA, E.; CAMMACK, R.; KULDA, J.; TACHEZY, J. Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. *Parasitology*, v.123, n.1, p.45-56, 2001.
- REIN, M. F. Clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in women. In: HONIGBERG, B. M., ed. *Trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York. 1990. p.225-234.
- ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling*, v.2, p.409-430, 2006.
- RÜCKERT, C.; STUEPP, C.; GOTTARDI, B.; ROSA, J.; CISILOTTO, J.; BORGES, F.; BOGO, M.; TASCA, T.; DE CARLI, G.; BONAN, C. Steroid hormones alter AMP hydrolysis in intact trophozoites of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*, v.105, n.6, p.1701-1706, 2009.
- 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. *Experimental Parasitology*, v.125, n.3, p.187-195, 2010.

- RYU, J. S.; KANG, J. H.; JUNG, S. Y.; SHIN, M. H.; KIM, J. M.; PARK, H.; MIN, D. Y. Production of interleukin-8 by human neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, v.72, n.3, p.1326-1332, 2004.
- SANSOM, F. M.; NEWTON, H. J.; CRISIS, S.; CIANCIOTTO, N. P.; COWAN, P. J.; D'APICE, A. J. F.; HARTLAND, E. L. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology*, v.9, n.8, p.1922-1935, 2008.
- SCHWEBKE, J. R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v.17, n.4, p.794-803, 2004.
- SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L.; HENNESSEY, T. M. RESEARCH REPORT: A Soluble Ecto-ATPase from *Tetrahymena thermophila*: purification and similarity to the membrane-bound Ecto-ATPase of smooth muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.337, n.2, p.351-359, 1997.
- SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and Africans. *Emergent Infectious Disease*, v.7, p.927-932, 2001.
- STEINBÜCHEL, A.; MÜLLER, M. Glycerol, a metabolic end product of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.20, n.1, p.45-55, 1986.
- TACHEZY, J.; KULDA, J.; BAHNÍKOVÁ, I.; SUCHAN, P.; RÁZGA, J.; SCHRÉVEL, J. *Tritrichomonas foetus*: Iron Acquisition from Lactoferrin and Transferrin. *Experimental Parasitology*, v.83, n.2, p.216-228, 1996.
- TASCA, T.; BONAN, C. D.; DE CARLI, G. A.; BATTASTINI, A. M.; SARKIS, J. J. Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity from intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Parasitology*, v.105, p.167-173, 2003.
- TASCA, T.; BONAN, C. D.; DE CARLI, G. A.; SARKIS, J. J. *Trichomonas vaginalis*: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability. *Parasitology Research*, v.93, p.300-303, 2004.
- TASCA, T.; BONAN, C. D.; DE CARLI, G. A.; SARKIS, J. J.; ALDERETE, J. F. Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*, v.131, p.71-78, 2005.

- TORRES-ROMERO, J. C.; ARROYO, R. Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infection, Genetics and Evolution*, v.9, n.6, p.1065-1074, 2009.
- 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. *Journal of Infectious Diseases*, v.197, n.4, p.548-554, 2008.
- VASCONCELOS, E. G.; FERREIRA, S. T.; CARVALHO, T. M. U. D.; SOUZA, W. D.; KETTLUN, A. M.; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 1996. Partial Purification and Immunohistochemical Localization of ATP Diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. IMMUNOLOGICAL CROSS-REACTIVITIES WITH POTATO APYRASE AND TOXOPLASMA GONDII NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE HYDROLASE, pp. 22139-22145, Vol. 271.
- VIIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncologica*, v.39, p.71-75, 2000.
- VIVIAN, J. P.; RIEDMAIER, P.; GE, H.; LE NOURS, J.; SANSOM, F. M.; WILCE, M. C. J.; BYRES, E.; DIAS, M.; SCHMIDBERGER, J. W.; COWAN, P. J.; D'APICE, A. J. F.; HARTLAND, E. L.; ROSSJOHN, J.; BEDDOE, T. Crystal structure of a *Legionella pneumophila* ecto-triphosphate diphosphohydrolase, a structural and functional homolog of the eukaryotic NTPDases. *Structure*, v.18, n.2, p.228-238, 2010.
- WANG, C. C. Validating targets for antiparasite chemotherapy. *Parasitology*, v.114, S31 - S44, 1997.
- WEIZENMANN, M.; FRASSON, A. P.; BARROS, M. P.; VIEIRA, P. B.; ROSEMBERG, D. B.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D.; TASCA, T. Kinetic characterization and gene expression of adenosine deaminase in intact trophozoites of *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiology Letters*, v.319, n.2, p.115-124, 2011.
- WILSON, M. E.; BRITIGAN, B. E. Iron acquisition by parasitic protozoa. *Parasitology Today*, v.14, n.9, p.348-353, 1998.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2001. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. Overview and Estimates WHO/HIV_AIDS/2001.02 and WHO/CDS/CSR/EDC/2001.10.

- YADAV, M.; GUPTA, I.; MALLA, N. Kinetics of immunoglobulin G, M, A and IgG subclass responses in experimental intravaginal trichomoniasis: prominence of IgG1 response. *Parasite Immunology*, v.27, n.12, p.461-467, 2005.
- ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.105, n.19, p.6882-6887, 2008.
- ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochemical Journal*, v.285, p.345-365, 1992.
- ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v.362, n.4, p.299-309, 2000.
- ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research*, v.5244-56, 2001.

VIII. Anexos

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

 **UFRGS** PRÓ-REITORIA DE PESQUISA 
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs

CARTA DE APROVAÇÃO

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs analisou o projeto:

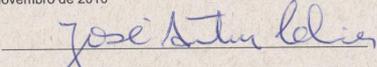
Número: 18923
Título: Diagnóstico laboratorial de tricomonose e candidíase em serviços de saúde pública em Porto Alegre, RS: prevalência e perfil de sensibilidade a fármacos

Pesquisadores:
Equipe UFRGS:

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

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

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


JOSE ARTUR BOGO CHIES
Coordenador da comissão de ética

1

VIII.2 Artigos publicados no período de vigência do mestrado

VIEIRA, P. B.; GIORDANI, R. B.; DE CARLI, G. A.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T. Screening and bioguided fractionation of Amaryllidaceae species with anti-*Trichomonas vaginalis* Activity. *Planta Medica*, v. 77, p. 1054-1059, 2011.

GIORDANI, R. B.; WEIZENMANN, M.; VIEIRA, P. B.; ROSEMBERG, D.; SOUZA A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry*, v. 72, p. 645-650, 2011.

WEIZENMANN, M.; BARROS, M. P.; FRASSON, A. P.; VIEIRA, P. B.; ROSEMBERG, D.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M.; BONAN, C. D.; TASCA, T. Kinetic characterization and gene expression of adenosine deaminase in intact trophozoites of *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 319, p. 115-124, 2011.

GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T. Candimine-induced Cell Death of the Amitochondriate Parasite *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Natural Products*, v. 73, p. 2019-2023, 2010.

FRASSON, A. P.; VIEIRA, P. B.; DE CARLI, G. A.; TASCA, T. *Giardia lamblia*: Distribuição de microtúbulos no citoesqueleto de trofozoítos e cistos utilizando taxóide fluorescente. *Revista de Patologia Tropical*, v. 39, p. 21-32, 2010.

