

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

Busca por alvo terapêutico na sinalização purinérgica em *Trichomonas vaginalis*: inibição do transportador de adenosina

MICHELI FERLA

PORTO ALEGRE, 2021

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

Busca por alvo terapêutico na sinalização purinérgica em *Trichomonas vaginalis*: inibição do transportador de adenosina

Dissertação apresentada por **Micheli
Ferla** para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Tiana Tasca

PORTO ALEGRE, 2021

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.09.2021, pela Banca examinadora constituída por:

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Marilise Brittes Rott

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ferla, Micheli

Busca por alvo terapêutico na sinalização purinérgica em *Trichomonas vaginalis*: inibição do transportador de adenosina / Micheli Ferla. -- 2021. 131 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, 2021.

1. *Trichomonas vaginalis*. 2. Sistema Purinérgico. 3. Restrição de soro. 4. Recaptação de adenosina. 5. Inibição do transporte de nucleosídeos. I. Tasca, Tiana, orient. II. Título.

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

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente à Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de ensino de qualidade e do qual me orgulho em fazer parte.

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

Aos membros da banca examinadora por terem aceito o convite.

À Prof^a Dr. Tiana Tasca pela orientação, acolhimento no grupo de pesquisa, ensinamentos, exemplos de ética, profissionalismo e dedicação à pesquisa. Agradeço também os incentivos, puxões de orelha, paciência em ensinar, e sobretudo, pela amizade. Tu és um exemplo de profissional e pesquisadora, obrigada por ter acreditado em mim desde os tempos da monitoria na cadeira de Parasitologia Clínica, TCC e até aqui. Tu és inspiração todos os dias para que eu possa me tornar uma pessoa e profissional melhor.

Aos queridos amigos que fiz no GPTrico Giulia, Fernanda, Mari, Saulo, Corina, foi uma honra poder compartilhar tantos momentos com vocês. Obrigada por contribuírem com uma palavra amiga, com muito trabalho, com idas ao sushi, mas principalmente, com muito café! Agradeço em especial às duas grandes amigas que compartilharam comigo momentos difíceis e me ensinaram muito durante esses anos de lab: Grazi e Ju Inesquecível. Obrigada por todas as contribuições e participação no desenvolvimento dessa dissertação. Muito obrigada pela amizade contruída, pelas conversas, pelo apoio e por todo o chocolate consumido.

Aos meus amigos Lucas e Janio por sempre terem uma palavra de incentivo, me apoiarem e pelos bons momentos compartilhados. A minha amiga Gabi e minha prima Fere pelo carinho de todos os dias. A minha amiga Nathalya por compartilhar momentos bons e ruins.

Aos meus pais, Iloi e Antonieta, por acreditar em mim, pelo incentivo diário, por apoiar em mim e nas minhas decisões. Meu irmão Marcus, minha cunhada Carol e minha sobrinha e afilhada Milena por tornarem meus domingos mais felizes. As minhas tias Maria, Ines e Délia por acreditarem em mim.

Mas principalmente ao meu namorado Alex, pelo teu apoio, companherismo, incentivo, ajuda e por me dar muito amor. Obrigada pelas inúmeras vezes que precisei de café e já estava pronto. Mas principalmente pela compreensão quando eu precisei, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis e pela paciência nos momentos de ausência.

"I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale"

Marie Skłodowska-Curie

RESUMO

Trichomonas vaginalis é um protozoário flagelado que parasita o trato urogenital humano e causa a tricomoníase, infecção sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo. Considerando seu impacto na saúde pública e a importância da busca de novos alvos terapêuticos, o estudo de seus aspectos bioquímicos é fundamental. *T. vaginalis* não é capaz de realizar a síntese *de novo* de purinas e pirimidinas, dependendo de vias de salvação para aquisição destas moléculas. Nucleotídeos extracelulares, especialmente o ATP, são liberados em situações de estresse atuando como sinalizadores pró-inflamatórios ao sistema imune. As enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase degradam ATP à adenosina, esta com ação anti-inflamatória. Como a adenosina encontrada no soro é essencial para a sobrevivência dos trofozoítos, neste estudo investigamos a influência da restrição de soro (1,0%) no crescimento de *T. vaginalis*, condição a qual promove um aumento na taxa de hidrólise de nucleotídeos pelas ectonucleotidases. Nossos dados mostraram que a privação de soro promove um aumento na taxa de hidrólise de nucleotídeos por ectonucleotidases. E que o inibidor da captação de adenosina, dipiridamol, inibiu fortemente o crescimento de *T. vaginalis* sob condição de limitação sérica. Além disso, a expressão gênica do transportador do nucleosídeo de *T. vaginalis* foi aumentada na presença do dipiridamol, indicando a resposta do parasita à condição estressante. Nossos resultados também mostraram uma interação sinérgica entre metronidazol e dipiridamol. Considerando a busca de novos alvos terapêuticos para o tratamento da infecção por *T. vaginalis*, os resultados obtidos nesta dissertação permitem a avaliação do comprometimento da recaptação de adenosina por meio da inibição de seus transportadores, o que pode ser fundamental no desenvolvimento de fármacos.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*. Sistema purinérgico. Restrição de soro. Recaptação de adenosina. Inibição do transporte de nucleosídeos

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is a flagellated protozoan that parasitizes the human urogenital tract and causes trichomoniasis, the most common non-viral sexually transmitted infection worldwide. Considering its impact on public health and the need for new therapeutic targets, understanding *T. vaginalis* biochemistry is essential. *T. vaginalis* is not capable of realizing *de novo* synthesis of purines and pyrimidines and depends on salvation pathways to acquire these molecules. Extracellular nucleotides, in particular ATP, are liberated under stress and act as pro-inflammatory signal to the immune system. Enzymes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase degrade ATP into adenosine, which is anti-inflammatory. Since adenosine is essential for the survival of trophozoites in serum, in this study we investigate the influence of serum restriction (1.0%) in the growth of *T. vaginalis*, a condition which promotes an increase in nucleotide hydrolysis by the ectonucleotidases. Our data showed that serum deprivation promotes an increase in the rate of nucleotide hydrolysis by ectonucleotidases, and that the adenosine uptake inhibitor, dipyridamole, strongly inhibited the growth of *T. vaginalis* under serum-limited conditions. Furthermore, the gene expression of *T. vaginalis*' nucleoside transporter increased in the presence of dipyridamole, indicating the parasite's response to the stressful condition. Our results also showed a synergistic interaction between metronidazole and dipyridamole. Considering the search for new therapeutic targets for the treatment of *T. vaginalis* infection, the results obtained in this dissertation allow the assessment of the impairment of adenosine reuptake through the inhibition of its transporters, which may be fundamental in the development of drugs.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*. Purinergic signaling. Serum restriction. Adenosine uptake. Nucleoside transporter inhibition.

LISTA DE FIGURAS

I. Revisão do tema

Figura 1: Características morfológicas de <i>T. vaginalis</i>	21
Figura 2: Esquema das vias de salvação de purinas em <i>T. vaginalis</i>	22
Figura 3: Esquema representativo dos principais mecanismos de patogenicidade de <i>T. vaginalis</i>	28
Figura 4: Estruturas químicas dos inibidores do transporte de adenosina, dilazep e dipiridamol; alopurinol, inibidor da xantina oxidase; e dos compostos 2,6-dicloro-9-metil-9H-purina e 2,6-dicloropurina.....	38

II. Capítulo 1

Figura 1. Components of the purinergic system.....	45
Figura 2. Extracellular nucleotide metabolism in <i>T. vaginalis</i> infection.....	50

III. Capítulo 2

Figura 1. Effect of 1.0% HIBS on <i>T. vaginalis</i> kinetic grow assay.....	71
Figura 2. Effect of 1.0% HIBS on NTPDase and E-5N activities.....	72
Figura 3. Effect of adenosine analog 2,6-Dichloro-9-methyl-9H-purine in <i>T. vaginalis</i>	74
Figura 4. Effect of adenosine analog 2,6-dichloro-9H-purine in <i>T. vaginalis</i>	76
Figura 5. Effect of adenosine transporters inhibitor dipyridamole, dilazep, and dipyridamole combined with dilazep in <i>T. vaginalis</i>	78
Figura 6. <i>T. vaginalis</i> kinetic growth curve at 1.0% HIBS in presence of adenosine uptake inhibitors dipyridamole and dilazep.....	84
Figura 7. Gene expression of <i>T. vaginalis</i> nucleoside transporter.....	86
Figura 8. FICI data for the <i>T. vaginalis</i> TV-LACM11 isolate for each combination tested of dipyridamole and metronidazole.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ACRs: Regiões Conservadas da Apirase
ADA: Adenosina desaminase
ATCC: American Type Culture Collection
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
CDF: Cell-detaching factor
CEVs: Células Epiteliais Vaginais
CP: Cisteínas peptidase
E-5N: Ecto-5'-nucleotidase
E-NTPDase: Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
FDA: Food and Drug Administration
HIBS: Heat-Inactivated Bovine Serum
HIV: Human Immunodeficiency Virus
IL: Interleucina
IST: infecção sexualmente transmissível
MTZ: Metronidazol
NO: Óxido Nítrico
OMS: Organização mundial da saúde
PDE3: Fosfodiesterase 3
PNK: Purina Nucleosídeo Quinase
PNP: Purina Nucleosídeo Fosforilase
qRT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa
Quantitativa
RNA: Ácido ribonucleico
ROS: Reative oxygen species
RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa
TCA: trichloroacetic acid
TNF- α : Tumour Necrosis Factor alpha
TNZ: Tinidazol
TvF: Cell-free factor
TV-LACM: Isolado de *T. vaginalis* proveniente de amostra de urina de paciente
o sexo feminino
TvLPG: Lipofosfoliglicano de *Trichomonas vaginalis*

SUMÁRIO

I. Introdução	15
II. Revisão do tema	19
II.1. <i>Trichomonas vaginalis</i>	20
II.2. Tricomoníase	23
II.3. Mecanismos de patogenicidade e resposta imune	25
II.4. Sistema Purinérgico	29
II.4.1. Ectonucleotidases	30
II.4.1.1 Ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (E-NTPDase)	30
II.4.1.2. Ecto-5'-Nucleotidase (E-5'N).....	31
II.4.1.3 Ectonucleotidases em <i>Trichomonas vaginalis</i>	32
II.4.2 ATP e adenosina.....	34
II.4.3. Transporte de nucleosídeos e inibidores	35
III. Objetivos	39
IV. Capítulo 1.....	41
IV. Capítulo 2.....	55
V. Discussão geral	97
VI. Conclusões	105
VII. Perspectivas	107
VIII. Referências.....	109
IX. Anexos.....	129

I. INTRODUÇÃO

A tricomoníase é a infecção sexualmente transmissível (IST) não viral mais comum no mundo, causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis* (ROWLEY, 2019). O parasito, que reside na mucosa do trato urogenital humano, causa manifestações clínicas de vaginite, como corrimento purulento, prurido, irritação e dor. A infecção pode causar uma série de complicações como infertilidade e doença inflamatória pélvica em mulheres em cerca de 6 meses (PETRIN, 1998; FICHOROVA, 2009; GOODMAN, 2011). Em homens os sintomas, quando presentes, incluem uretrite, prostatite, função espermática reduzida e prurido leve ou sensação de queimação após a relação sexual (LEHKER e ALDERETE, 2000). No entanto, cerca de 80% dos pacientes, incluindo ambos os sexos, são assintomáticos. Além disso, a infecção também está associada a complicações na gravidez, câncer de colo do útero e transmissão e aquisição de HIV e HPV (EDWARDS, 2016; NOËL, 2010).

Embora a infecção seja leve e curável, a tricomoníase é um problema de saúde pública. No Brasil, o Ministério da Saúde estima uma prevalência geral de 15% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005), mas este número pode ser subestimado devido à baixa sensibilidade dos métodos de diagnóstico utilizados e ao aumento do número de casos assintomáticos (POOLE, 2013), além de existirem poucos estudos de prevalência com boa qualidade. Nos Estados Unidos há uma estimativa de custo aproximado de US\$ 167 milhões gastos por ano em infecções por HIV associadas ao *T. vaginalis* (CHESSON, 2004). Esses dados são essenciais, porém no Brasil estão indisponíveis devido à falta de notificação no diagnóstico da tricomoníase. A alta prevalência e a crescente resistência ao tratamento, apesar do incentivo à proteção, incluindo comportamento sexual, bem como a associação com complicações de saúde, têm suscitado preocupação com esta doença (SECOR, 2014).

Os únicos dois fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA, USA) para o tratamento da tricomoníase são metronidazol (MTZ) e tinidazol (TNZ), que pertencem à classe dos 5-nitroimidazóis (WORKOWSKI, 2021). O mecanismo de ação destes fármacos é baseado na formação de um ânion nitro-radical, que é um radical citotóxico gerado pela redução do MTZ, o qual gera danos em macromoléculas como ácidos nucleicos e proteínas, levando o parasito à morte (EDWARDS, 2016). O fármaco de escolha é o MTZ, e o tratamento demonstrou produzir resistência, reações alérgicas e falha na

eliminação da infecção ocasionalmente causando, náusea, vômito, diarreia, desconforto abdominal e hipersensibilidade (WORKOWSKI, 2021). Sem tratamentos alternativos aprovados, os pacientes com infecções resistentes precisam usar doses mais altas de MTZ ou TNZ (ALI, 2007; ALESSIO *et al.*, 2019). Considerando a importância do *T. vaginalis* na saúde pública, as falhas no tratamento e a falta de opções terapêuticas, a busca de compostos anti-*T. vaginalis*, assim como estudo de novos alvos, são de extrema relevância.

O sistema purinérgico é uma rede de sinalização celular em que nucleotídeos e nucleosídeos são regulados por enzimas chamadas ectonucleotidases e podem se ligar a receptores específicos chamados purinoceptores, cuja ativação altera a função imune celular (BURNSTOCK, 2014). Nucleotídeos e nucleosídeos são moléculas encontradas em microambientes intra e extracelulares, apresentam vários papéis biológicos, e podem ser armazenados em vesículas ou secretados, ligando-se então, aos receptores específicos (SCHMIDT *et al.*, 2007). Os purinoceptores são classificados em P1 e P2. Os receptores P1 medeiam a interação com a adenosina extracelular, enquanto os receptores P2 reconhecem ATP, ADP, UTP e UDP (FREDHOLM *et al.*, 2001; FALK *et al.*, 2012).

As ectonucleotidases participam da via de salvação na recaptação de nucleosídeos de purina e pirimidina, já que *T. vaginalis* não realiza a *síntese de novo* (MUNAGALA e WANG, 2003). Os nucleosídeos 5'-tri- e difosfatados podem ser hidrolisados por ação das enzimas pertencentes à família ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (E-NTPDase), enquanto os nucleosídeos 5'-monofosfatos podem sofrer a hidrólise pela atividade da ecto-5'-nucleotidase (E-5N) (ZIMMERMANN, 2021). Outra enzima tem papel importante na regulação dos níveis de nucleosídeos extracelulares, a adenosina desaminase (ADA), convertendo adenosina em inosina (LE *et al.*, 2019). A presença dessas enzimas modula as concentrações de nucleotídeos e nucleosídeos que regulam as respostas inflamatórias, além de outros papéis biológicos (ZIMMERMANN, 2020).

Em parasitos dois transportadores de nucleosídeo de purinas já foram identificados e estudados. O primeiro é um transportador de adenosina e o segundo é um transportador de inosina. O transportador de adenosina tem alta afinidade para a adenosina, mas não é estritamente específico para a adenosina

(EL KOUNI, 2003). Já *T. vaginalis* tem dois transportadores de nucleosídeos, um inespecífico e o outro transporta adenosina, guanosina e uridina (HARRIS *et al.*, 1988). Em *T. vaginalis*, nosso grupo realizou a caracterização da cadeia enzimática que metaboliza ATP a adenosina: NTPDase (MATOS *et al.*, 2001), E-5N (TASCA *et al.*, 2003) e ADA (WEIZNEMANN *et al.*, 2011). Dados interessantes sobre a geração do nucleosídeo adenosina demonstram que é substrato para ADA de *T. vaginalis*, mas não guanosina (WEIZNEMANN *et al.*, 2011) e que adenosina é recaptada pelos trofozoítos enquanto guanosina acumula no meio extracelular (MENEZES *et al.*, 2017). Inibidores do transporte de nucleosídeos em células mamíferas são ineficazes em parasitos ou células parasitadas. Nitrobenzylthioinosine (NBMPR), dilazep e dipiridamol são os inibidores mais comumente utilizados. Em *T. vaginalis* nenhum dos dois transportadores é inibido completamente por NBMPR ou dilazep (EL KOUNI, 2003).

Entender os aspectos fisiológicos e moleculares envolvidos na patogenicidade do parasito é essencial para compreender a interação parasito-hospedeiro e, conseqüentemente, fundamental para a caracterização de novos alvos terapêuticos no desenvolvimento de novas moléculas.

II. REVISÃO DO TEMA

II.1. *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis é um protozoário extracelular que pertence à família Trichomonadidae, à ordem Trichomonadida, à classe Parabasalia e ao filo Zoomastigina (SCHWEBKE e BURGESS, 2004). O parasito flagelado foi descrito em uma amostra de secreção vaginal pela primeira vez em 1836 pelo médico francês Alfred Donné (SINGH, 2007) e tem como único hospedeiro o ser humano, habitando ao trato urogenital.

O protozoário é esférico e possui forma de pêra em cultura, medindo em média 10 µm de comprimento e 7,0 µm de largura; apresenta cinco flagelos, quatro flagelos anteriores e o quinto incorporado na membrana ondulante, responsáveis pela motilidade (DE CARLI e TASCA, 2016). Além disso, a divisão celular ocorre por fissão binária longitudinal, sem o desaparecimento da membrana nuclear (BENCHIMOL, 2004). Em meios de cultura as formas tendem a ser mais uniformes, tipicamente piriformes, do que as observadas em secreção vaginal e urina (DE CARLI e TASCA, 2016). Da mesma forma que outros tricomonadídeos, *T. vaginalis* não apresenta a forma cística (BRADIC e CARLTON, 2018), podendo ocorrer a transformação morfológica para formação de pseudocistos ou formas endoflagelares, onde não há a formação de uma parede cística verdadeira (BENCHIMOL, 2004). Condições físico-químicas podem alterar a aparência do parasito, como mudanças do pH, tensão de oxigênio, força iônica e temperatura. O protozoário assume uma forma mais ameboide ao aderir às células epiteliais vaginais (CEVs) (PETRIN, 1998).

O ciclo de vida é simples e a transmissão ocorre por ato sexual (FICHOROVA, 2009). Possui um citoesqueleto composto por fibras de tubulina e actina. O núcleo é elipsoide, está localizado na sua porção anterior e é envolto por um retículo endoplasmático (PETRIN, 1998). O axóstilo é uma estrutura rígida e hialina que se projeta no interior do parasito participando do processo de cariocinese. Além disso, no seu interior evidencia-se a presença do aparelho parabasal e filamentos parabasais, além do aparelho de Golgi que é composto por diversas vesículas. Assim como os outros tricomonadídeos, *T. vaginalis* não possui mitocôndria e peroxissomos, e sim uma organela chamada hidrogenossomo que participa do metabolismo do piruvato formado durante a

glicólise, formação do hidrogênio molecular e síntese de ATP (BENCHIMOL, 2004).

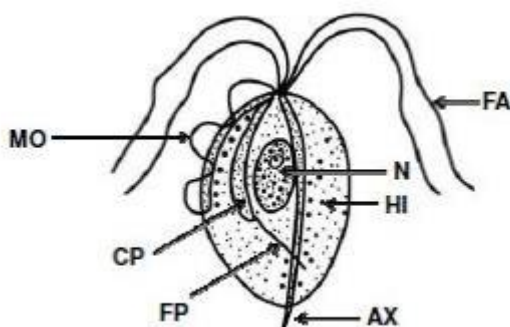


Figura 1: Características morfológicas de *T. vaginalis*. MO: membrana ondulante, CP: corpo parabasal, FP: filamento parabasal, AX: axóstilo, HI: hidrogenossomo, N: núcleo, FA: flagelos anteriores livres. Adaptado: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Trichomoniasis.html>.

Para garantir a sua sobrevivência e assegurar o sucesso da infecção, *T. vaginalis* depende de nutrientes essenciais ao seu metabolismo. Através da secreção vaginal e da fagocitose de bactérias e células do hospedeiro, o protozoário é capaz de obter carboidratos, aminoácidos, lipídeos, ferro, vitaminas e nucleotídeos púricos e pirimidínicos (PETRIN, 1998). Os carboidratos representam a principal fonte de energia e seu metabolismo é fermentador sob condições anaeróbicas e aeróbicas, resultando em produtos como acetato, lactato, malato, glicerol, CO₂ e, em condições anaeróbicas, H₂ (DE CARLI e TASCA, 2016). Na ausência de carboidratos os aminoácidos se tornam a principal fonte de energia, especialmente arginina, treonina e leucina (PETRIN, 1998). Em relação aos lipídeos, possui colesterol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e esfingomielina como seus principais fosfolipídios (PETRIN, 1998). O parasito requer ácidos graxos e esteróis de fontes exógenas.

Na ausência da capacidade de sintetizar purinas e pirimidinas *de novo* (HEYWORTH, 1982), rotas de salvação para aquisição dessas moléculas são empregadas pois o parasito necessita de adenina e guanina ou seus nucleosídeos, além de timidina, citidina, uracila e/ou uridina (PETRIN, 1998). O sistema de salvação de purinas é constituído por uma via com a presença de

duas enzimas, a purina nucleosídeo fosforilase (PNP, do inglês *Purine Nucleoside Phosphorylase*) e a purina nucleosídeo quinase (PNK, do inglês *Purine Nucleoside Kinase*). A PNP catalisa a conversão entre bases em nucleosídeos púricos enquanto a PNK converte nucleosídeos em nucleotídeos (HEYWORTH, 1982; MILLER, 1983). Além disso, não há atividade da purina fosfotribosiltransferase (PRTase, do inglês *Purine Phosphoribosyltransferase*), ou seja, *T. vaginalis* não incorpora hipoxantina ou inosina nos nucleotídeos púricos (HEYWORTH, 1982). Os nucleotídeos de purina em *T. vaginalis* são sintetizados a partir de adenosina e as atividades da PNP e PNK incorporam adenina e guanina exógenas (MUNAGALA e WANG, 2003).

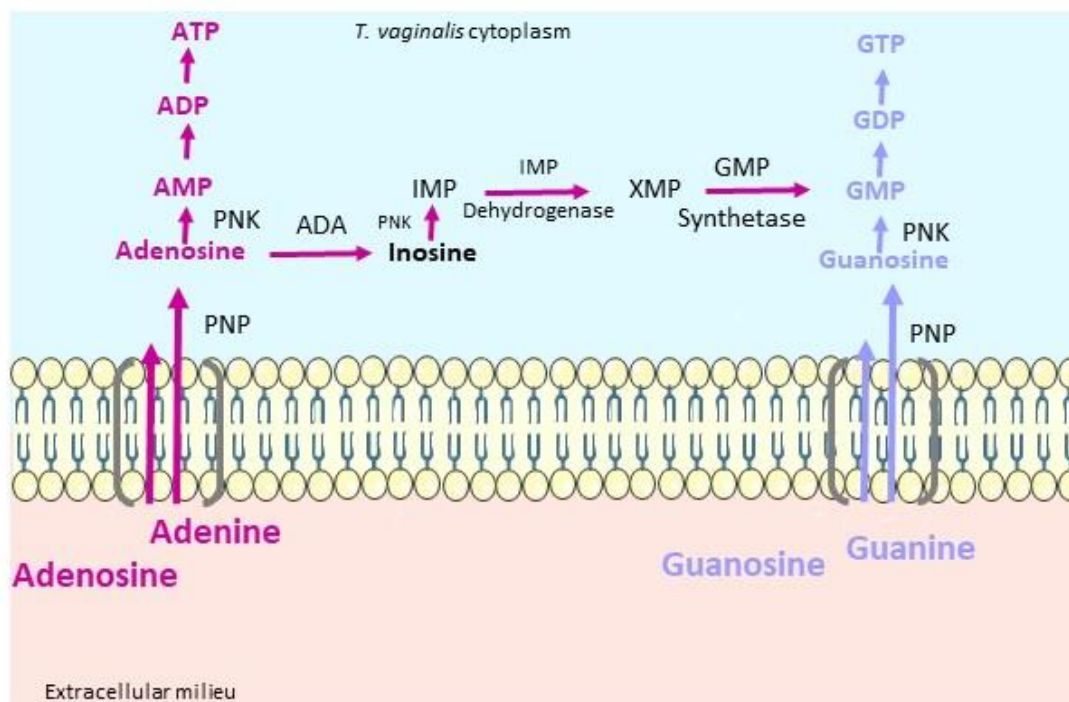


Figura 2: Esquema das vias de salvação de purinas em *T. vaginalis*. PNP: purina nucleosídeo fosforilase; PNK: purina nucleosídeo quinase; ADA: adenosina deaminase. Adaptado de MUNAGALA e WANG, 2003, com autorização, anexo IX.1.1. Elementos gráficos utilizados na construção da figura obtidos através do site: www.servier.fr.

Parasito obrigatório, *T. vaginalis* necessita de enzimas para sintetizar macromoléculas, principalmente purinas, pirimidinas e lipídeos, adquirindo

esses nutrientes e também vitaminas, sais minerais como o ferro, através de secreção vaginal ou destruição das células do hospedeiro e bactérias (HARP, 2011; PETRIN, 1998; CUDMORE, 2004). Devido ao microambiente vaginal estar em constante mudança principalmente durante o ciclo menstrual, com o influxo de eritrócitos, macromoléculas hospedeiras e constituintes séricos, há também grandes mudanças no pH, sendo assim, a forma utilizada para aquisição de nutrientes é a fagocitose. Além disso, a sobrevivência e o estabelecimento da infecção dependem da sua adaptação a esse ambiente cheio de mudanças (PETRIN, 1998; FIGUEROA-ANGULO, 2012).

Os nutrientes captados do micro ambiente extracelular são essenciais para a sobrevivência e crescimento do parasito. A investigação de vias de salvação de purinas e enzimas envolvidas nesse metabolismo, assim como restrição desses nutrientes e o efeito na patogenicidade são importantes para o entendimento desses processos no estabelecimento e manutenção da infecção.

II.2. Tricomoníase

Trichomonas vaginalis é o agente da tricomoníase, a infecção sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo. Quando combinada com clamídia, gonorréia e sífilis, essas infecções são responsáveis por 376,4 milhões de casos, com uma prevalência de 110,4 milhões de casos de tricomoníase (ROWLEY, 2019). Mesmo com a alta prevalência, há poucos estudos abrangentes apresentando estes dados, além da baixa sensibilidade do exame direto a fresco, o método mais utilizado no diagnóstico laboratorial, bem como as estimativas de duração da infecção são limitadas e o aumento do número de casos assintomáticos, tornando os números subestimados (FICHOROVA, 2009; SECOR, 2014; WHO, 2012). O controle da infecção não recebe atenção de programas de saúde, além de a tricomoníase não ser notificável e não existir um sistema de vigilância e identificação de isolados resistentes ao tratamento (SCHWEBKE e BURGESS, 2004; WHO, 2012).

A infecção por *T. vaginalis* pode causar uma série de manifestações clínicas ou se apresentar assintomática (MIELCZAREK e BLASZKOWSKA, 2016). Em mulheres com quadro sintomático agudo a inflamação é caracterizada

por corrimento purulento, irritação e prurido vulvar. Além disso, ocorrem também dor abdominal e disúria, podendo até apresentar *colpitis macularis* ou cérvix com aspecto de morango, que se caracteriza por pontos hemorrágicos na mucosa vaginal ou cervical acompanhados de edema e eritema (MILLER, 2011). Os homens, quando sintomáticos, podem apresentar uretrite, epididimite e prostatite (FICHOROVA, 2009). As glândulas prostáticas são um ambiente hostil e ricas em zinco. O zinco tem efeito tricomonicida que ajuda a limitar ou resolver a infecção na maioria dos homens (FIGUEROA-ANGULO, 2012). A concentração de zinco (4,5 - 7,0 mM) encontrada nas secreções prostáticas apresenta efeito tóxico ao parasito (SEÑA, 2007).

Apesar das manifestações clínicas serem bem conhecidas, cerca de 80% dos casos de tricomoníase são assintomáticos, incluindo mulheres e homens, levando a infecções crônicas e complicações como parto prematuro, aumento da mortalidade infantil, doença inflamatória pélvica e câncer cervical e prostático (POOLE, 2013; CHAPIN, 2011; EDWARDS, 2016; MIELCZAREK, 2016; SUTCLIFFE, 2010). Embora rara, a transmissão vertical já foi descrita com uma incidência de 2,0 a 17%. O neonato entra em contato com os trofozoítos aderidos às células epiteliais da vagina e assim causam doença respiratória com produção de muco (BRUINS, 2013; VIEIRA, 2017).

A infecção por *T.vaginalis* tem sido associada à aquisição e transmissão do HIV devido a mecanismos como resposta imunológica aprimorada, alteração da microbiota normal e pH, produzindo um ambiente próspero para o HIV (QUINLIVAN, 2012; KISSINGER, 2013). O parasito induz a resposta imune levando ao recrutamento de linfócitos CD4+ e macrófagos, provoca pontos hemorrágicos comprometendo a barreira mecânica e assim a monocamada do epitélio do hospedeiro é danificada (GILBERT, 2000). Com o acúmulo de linfócitos CD4+, que são as células-alvo do HIV, há a possibilidade de uma alta carga viral infectá-los (MOODLEY, 2002). A secreção de cisteína peptidases degrada o inibidor de protease leucocitária secretória, que é um fator de proteção das mucosas que desempenha um papel importante na prevenção da transmissão do HIV (GILBERT, 2000). Assim, o controle da infecção por *T. vaginalis* passa a ser um meio de controle para o manejo do risco de transmissão e aquisição do HIV.

Existem apenas dois medicamentos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) para o tratamento da tricomoníase, metronidazol (MTZ) e tinidazol (TNZ), utilizados normalmente via oral, 2,0 gramas em dose única, sendo o metronidazol o fármaco de escolha (WORKOWSKI, 2015). Os dois fármacos pertencem a mesma classe, 5-nitroimidazóis, apresentando o mecanismo de ação que inicia pela entrada do composto por difusão no trofozoíto, e redução do grupamento nitro pela enzima piruvato-ferredoxina óxido redutase que está presente no hidrogenossomo, com produção de radicais-nitro citotóxicos que induzem a quebra da fita de DNA, causando a morte do parasito (KULDA, 1999). Esses fármacos apresentam uma série de efeitos adversos, incluindo náusea, vômito, dor de cabeça, insônia, tontura e sonolência (MENEZES, 2016). Como mutagenicidade e teratogenicidade não foram comprovadas, *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, EUA) recomenda a utilização de MTZ na gestação (VIEIRA, 2017). As falhas terapêuticas incluem resistência dos isolados aos medicamentos, estimada em 9,6% e foi descrita pela primeira vez em 1962 (ROBINSON, 1962; DUNNE, 2003; SCHWEBKE, 2006). Esses valores, quando comparados à prevalência e incidência, geram números preocupantes de 160.000 pessoas nos EUA e aproximadamente 10 milhões em todo o mundo, exigindo tratamento alternativo (SECOR, 2014). Atualmente, não existem opções para o tratamento oral da tricomoníase além dos mencionados, MTZ e TNZ, tornando essencial a busca de novos alvos e moléculas terapêuticas.

II.3. Mecanismos de patogenicidade e resposta imune

Para garantir sua sobrevivência e o estabelecimento da infecção, *T. vaginalis* depende da capacidade de se adaptar às variações da microbiota do hospedeiro (PETRIN, 1998; ARROYO, 1993; FIGUEROA-ANGULO, 2012). O parasito reage às mudanças drásticas do ambiente como temperatura, pH, zinco, poliaminas, microbiota com a presença de lactobacilos, ciclo menstrual, alteração hormonal, ferro e resposta imunológica do hospedeiro e isso leva à modulação de genes, incluindo os que codificam fatores de virulência (LEHKER e ALDERETE, 2000; ALVAREZ-SANCHEZ, 2008; KUCKNOOR, 2005).

O *T. vaginalis* é um patógeno de mucosa, extracelular e portanto, o primeiro passo é se estabelecer no sítio de infecção. Essa etapa é fundamental e para que isso seja possível o trofozoíto precisa se aderir à célula do hospedeiro e secretar moléculas que ajudarão a vencer as barreiras protetoras (LEHKER e ALDERETE, 2000). O trofozoíto entra em contato com as células epiteliais e sofre mudanças morfológicas, onde sua morfologia piriforme se torna ameboide. Essa transformação leva à formação de áreas onde a célula-alvo e o trofozoíto estão fortemente associados e sinais podem ser trocados entre os dois (KUCKNOOR, 2005; FIGUEROA-ANGULO, 2012). O sítio da infecção é o trato urogenital e o ambiente é recoberto por uma camada de muco que tem função protetora e proporciona uma barreira física e química. Para que a colonização aconteça é necessário que o parasito degrade os componentes da matriz mucosa através da produção de mucinases que são enzimas proteolíticas que degradam o muco permitindo o avanço do trofozoíto na matriz (FIGUEROA-ANGULO, 2012; CURLIN, 2013; LEHKER e SWEENEY, 1999).

A etapa de citoaderência é uma das principais vias de colonização e permite que o parasito conduza a infecção ao estágio crônico (FIGUEROA-ANGULO, 2012). Proteínas de superfície, denominadas adesinas, são responsáveis pela aderência do parasito à célula-alvo e durante esse processo possuem as suas expressões gênicas aumentadas: AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23 (ARROYO, 1992; GARCIA, 2003; MORENO-BRITO 2005). Quatro dessas enzimas possuem função metabólica dependendo da sua localização no hidrogenossomo ou no citoplasma e são denominadas: AP120 ou PFOR (piruvato-ferredoxina oxidoreductase), AP65 é a enzima málica, AP51 e AP33 são respectivamente, α succinil-CoA sintetase e β succinil-coA sintetase. Adicionalmente, dependendo de sua localização podem atuar como receptores de hemoglobina e grupamento heme e ainda participar de mecanismos de mimetização para evadir a resposta imune do hospedeiro (LEHKER e ALDERETE, 2000; ALDERETE, 2001; FIGUEROA-ANGULO, 2012). Já a AP23 ainda não foi caracterizada (FIGUEROA-ANGULO, 2012). Além das adesinas, o trofozoíto apresenta em sua superfície o lipofosfoglicano (TvLPG) e as cisteínas peptidases (CPs), como TvCP30 e TvCP62, que também participam da citoaderência (FICHOROVA, 2006). O TvLPG é um componente do glicocálice e auxilia na ligação do parasito aos receptores de galectina-1 e galectina-3 da

célula hospedeira, além da modulação da resposta imune e na mudança para a forma ameboide (FICHOROVA, 2006; MENEZES, 2016).

O processo de infecção começa com a citoaderência e é seguido por um efeito de citotoxicidade que envolve citólise, fagocitose e degradação das monocamadas celulares (FIQUEROA-ANGULO, 2012). Mecanismos de aquisição de nutrientes e evasão da resposta imune são essenciais para que o processo continue. *T. vaginalis* fagocita *Lactobacillus acidophilus*, leveduras, espermatozoides, células epiteliais e prostáticas, leucócitos e eritrócitos (PEREIRA-NEVES, 2007; ARROYO, 1992). A fagocitose pode ser considerada um mecanismo de virulência para aquisição de nucleotídeos, lipídeos e ferro (FIGUEROA-ANGULO, 2012). O processo de citotoxicidade para aquisição de nutrientes e evasão da resposta imune pode ser dependente ou independente de contato com a célula-alvo. No processo contato-dependente as células sofrem lise, fagocitose e desintegração da sua monocamada ou neutrófilos e macrófagos (KANG, 2006). No processo contato-independente o parasito secreta moléculas como TvF (cell-free *T. vaginalis* culture factor) e CDF (cell-detaching factor) que induzem o arredondamento, aglutinação e descolamento celular. Outras CPs como TvCP39 e TvCP65, que degradam proteínas e requerem poliaminas para sua expressão, além de serem reguladas pelo ferro e zinco, também estão envolvidas na citotoxicidade (FIGUEROA-ANGULO, 2012).

Para sobreviver no ambiente vaginal em constante mudança, devido principalmente às mudanças que ocorrem durante o ciclo menstrual, o parasito precisa desenvolver mecanismos de evasão da resposta imune (FIGUEROA-ANGULO, 2012): (a) o sistema complemento encontrado no sangue menstrual é capaz de matar o parasito, sendo assim, uma CP que é regulada pelo ferro é capaz de degradar a porção C3b do complemento (LEHKER e ALDERETE, 2000); (b) CPs como TvCP39 e TvCP65 degradam as imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) (HERNANDEZ-GUTIERREZ, 2004); (c) P270 e P230, proteínas imunógenas, estão envolvidos na variação fenotípica, enquanto P230 está envolvida na alteração da acessibilidade do epítipo à ligação ao anticorpo, já a P270 mostra a organização estrutural das proteínas transmembranares (ALDERETE, 1999); (d) mimetismo molecular apresentando adesinas (AP65, AP51 e AP33) em sua membrana, ou seja, moléculas homólogas às proteínas do hospedeiro (ALDERETE, 2001); (e) secreção contínua de proteínas solúveis

altamente imunogênicas capazes de neutralizar anticorpos e linfócitos T citotóxicos (LEHKER e ALDERETE, 2000); (f) controle e destruição de células do sistema imune por indução de apoptose (KANG, 2006).

O genoma do *T. vaginalis* contém genes que codificam um grande número de famílias de proteínas e isso pode ser responsável pela adaptação do parasito. Mudanças na temperatura, pH e concentração de poliaminas, ferro e zinco são exemplos disso. As poliaminas como putrescina, espermidina e espermina, regulam processos vitais para a manutenção das células e são encontradas em altos níveis ($> 2,0$ mM) em fluidos vaginais na presença do parasito (YARLETT, 2000). As proteínas citoplasmáticas e hidrogenossômicas ferro-enzimas desempenham um papel essencial fazendo assim com que o *T. vaginalis* possua mecanismos de captação do ferro (TORRES-ROMERO, 2009). Assim como o ferro, o zinco desempenha um papel importante na sobrevivência do protozoário. Cerca de 70% dos casos são assintomáticos. As concentrações de zinco (4,5 - 7,0 mM) podem impedir a adesão às células e quando encontrado em altas concentrações no fluido prostático, o zinco tem efeito tricomonocida; no entanto, em homens com prostatite crônica a concentração de zinco é menor que 1,6 mM e não apresenta efeito prejudicial ao parasito (KRIEGER, 1982; PETRIN, 1998; SEÑA, 2007).

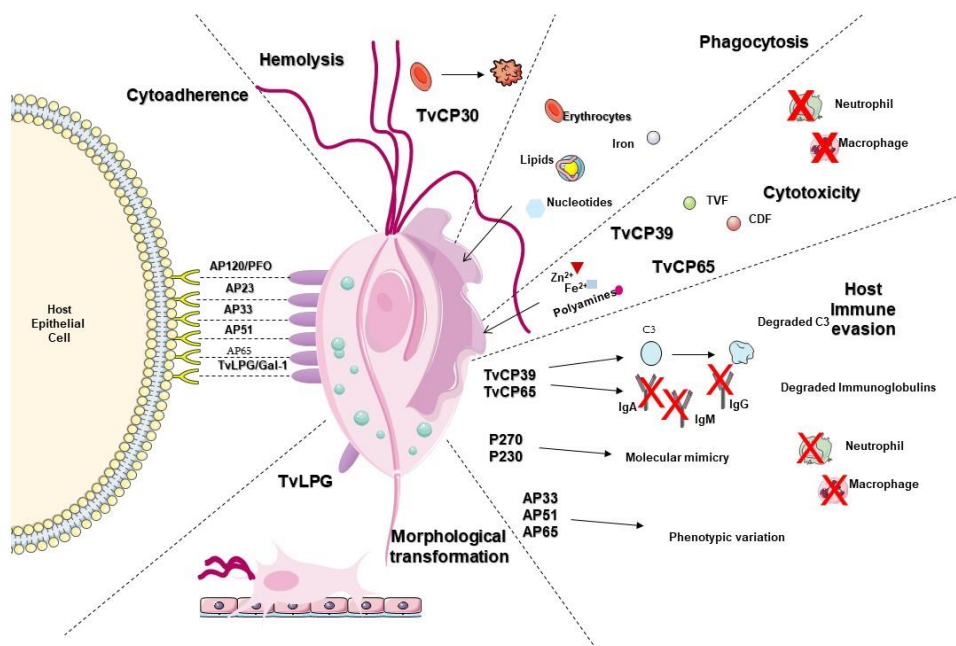


Figura 3: Esquema representativo dos principais mecanismos de patogenicidade de *T. vaginalis*. Adaptado de FIGUEROA-ANGULO et al., 2012,

com autorização, anexo IX.1.2. Elementos gráficos utilizados na construção da figura obtidos através do site: www.servier.fr.

II.4. Sistema Purinérgico

Encontrados em ambientes extra e intracelulares, os nucleotídeos e nucleosídeos são moléculas essenciais que apresentam inúmeros papéis biológicos. O ATP é um dos nucleotídeos de purinas que apresenta uma variedade de funções (SCHMIDT, 2007). Enquanto o ATP intracelular é responsável pela produção de energia, biossíntese, transporte ativo e motilidade celular, o ATP extracelular é responsável pela sinalização molecular, onde atua na inflamação, resposta imune, funções cardíacas, neurotransmissão e contração muscular (BURNSTOCK, 2006).

Geoffrey Burnstock introduziu o conceito de transmissão purinérgica e demonstrou que o ATP atendia os critérios para ser considerado um neurotransmissor em 1972 (BURNSTOCK, 1972). Outros nucleotídeos (ADP, UTP, UDP), assim como o ATP, tiveram suas funções estabelecidas e foi visto que a secreção ocorre através de transportadores, exocitose e difusão por canais de membrana (ABBRACCHIO, 2006). Esses nucleotídeos podem ser armazenados em vesículas e podem ser liberados por uma célula com dano na membrana celular (FREDHOLM, 2011; BURNSTOCK, 2007). Quando secretados para o meio extracelular esses nucleotídeos são degradados por enzimas chamadas ectonucleotidases (ZIMMERMANN, 2001).

Os nucleotídeos e nucleosídeos ativam receptores de membrana chamados purinoceptores (BURNSTOCK, 1976). Esses purinoceptores são classificados como P1 e P2. A classe de purinoceptores P1 corresponde a quatro subtipos: A1, A2A, A2B e A3 e medeiam a interação com a adenosina extracelular, com diferentes afinidades (FREDHOLM, 2001). Os receptores P1 acoplados à adenilato ciclase: A1 e A3 são capazes de inibi-la, enquanto A2A e A2B são responsáveis pela sua ativação, com produção de AMP cíclico (cAMP) (RALEVIC, 1998). A classe dos receptores P2 é classificada em P2X e P2Y e reconhecem ATP, ADP, UTP e UDP. A subclasse P2X é dividida em sete subtipos (P2X1-7), ligados aos canais de cátions e possuem um sítio de ligação

para ATP (BURNSTOCK, 2007). A subclasse P2Y é subdividida em P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14 (ABBRACCHIO, 2006), e responde ao ATP, mas a maior afinidade apresentada é ao ADP, UTP e UDP (BURNSTOCK, 2006b; ABBRACCHIO, 2009).

II.4.1. Ectonucleotidases

Os nucleotídeos liberados são degradados por enzimas localizadas na superfície das células ou solúveis no meio intersticial produzindo assim, nucleosídeos e fosfato livre. A atividade catalítica máxima é adaptada ao ambiente extracelular e requer a presença de cátions divalentes, como cálcio ou magnésio, e pH alcalino (ZIMMERMANN, 2000).

As principais enzimas envolvidas na hidrólise de nucleotídeos incluem quatro famílias que compartilham parcialmente a distribuição tecidual e a especificidade do substrato, i) a família de ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) que hidrolisa nucleosídeos 5'-tri e -difosfatados; ii) a família de ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP); iii) fosfatases alcalinas e iv) a ecto-5'-nucleotidase (E-5N) que hidrolisa nucleosídeos monofosfatados produzindo os nucleosídeos correspondentes (ZIMMERMANN, 2001). A adenosina desaminase (ADA) é outra enzima que tem papel importante na regulação dos níveis de nucleosídeos extracelulares e ela converte adenosina em inosina (FRANCO, 1997; MUNAGALA, 2003; BAGHERI, 2019).

II.4.1.1 Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase)

As enzimas da família E-NTPDase podem hidrolisar o nucleosídeo 5'-trifosfatado e o nucleosídeo 5'-difosfatado. Os membros dessa família já foram identificados em vertebrados e invertebrados como plantas, leveduras e protozoários. A família E-NTPDase é composta de oito membros que compartilham cinco domínios de sequência altamente conservados, ACRs

(*Apyrase Conserved Regions*) que são de grande relevância catalítica (HANDA, 1996; ZIMMERMANN, 2000; KNOWLES, 2011).

Os membros da família E-NTPDase possuem diferenças quanto a preferência pelo substrato e também pela sua localização. NTPDases 1, 2, 3 e 8 estão localizadas na superfície celular. A NTPDase 1 hidroliza ATP e ADP de forma semelhante, enquanto a NTPDase 2 tem forte preferência pelo ATP e as NTPDases 3 e 8 preferem ATP e ADP. As NTPDase 4 e 7 estão ligadas à membrana das organelas. Enquanto a NTPDase 4 possui uma forma ligada a vacúolos lisossomais/autofágicos e outra forma ligada ao complexo de Golgi, possui alta afinidade ao UDP mas não ao ATP e ADP, já a NTPDase 7 se localiza nas vesículas intracelulares e tem maior afinidade por nucleotídeos trifosfatados. E por fim, as NTPDases 5 e 6 estão localizadas intracelularmente e ambas tem alta preferência por nucleotídeos difosfatados (ZIMMERMANN, 2001; KNOWLES, 2011).

II.4.1.2. Ecto-5'-Nucleotidase (E-5'N)

A ecto-5'-nucleotidase conhecida como proteína de superfície de linfócitos CD73, representa um marcador de maturação para os linfócitos T e B, também possui ampla distribuição tecidual (ZIMMERMANN, 2000). A enzima também pode estar envolvida na adesão celular (BRAUN, 1998; ZIMMERMANN, 2001) e há relatos de sua presença em vertebrados, plantas, bactérias e protozoários. É classificada de acordo com a localização e propriedades bioquímicas e pode ser solúvel no meio extracelular ou citoplasma, e também estar ancorada à membrana plasmática via glicosilfosfatidil inositol (GPI) (ZIMMERMANN, 1992).

A ecto-5'-nucleotidase catalisa a etapa final da degradação extracelular de nucleotídeos, a hidrólise do nucleosídeo 5'-monofosfatados nos respectivos nucleosídeos e fosfato inorgânico, e é possivelmente a principal enzima responsável por essa hidrólise, desempenhando também um papel importante na formação de adenosina a partir de AMP extracelular (ZIMMERMANN, 2001).

II.4.1.3 Ectonucleotidases em *Trichomonas vaginalis*

A cascata de degradação enzimática através da hidrólise do ATP à adenosina desempenha um papel importante na limitação da resposta inflamatória, garante a sobrevivência do *T. vaginalis*, além de garantir que o parasito tenha sucesso na evasão da resposta imune do hospedeiro. Participar da via de salvação de purinas, uma vez que o parasito não realiza síntese *de novo* e necessita recaptar a adenosina do meio externo, é uma das funções das ectonucleotidases (MUNAGALA e WANG, 2003).

MATOS *et al.*, 2001 caracterizaram a enzima NTPDase de *T. vaginalis*, comparando a atividade em trofozoítos intactos e rompidos, demonstrando a presença de uma enzima de superfície capaz de hidrolisar ATP e ADP, cuja atividade é dependente de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Investigações no genoma do parasito, revelaram a presença de genes que codificam proteínas que apresentam domínios transmembrana na região C-terminal e atividade extracelular, indicando que estas proteínas estão ancoradas à membrana celular e atuam como ectoenzimas (TASCA *et al.*, 2004; SANSOM *et al.*, 2008). Na presença de galactose, que é um monossacarídeo que está envolvido na adesão de *T. vaginalis* às células hospedeiras, a enzima NTPDase apresentou um aumento de 90% na sua atividade, revelando um possível papel desta enzima na aderência, além de mostrar que sua atividade pode estar relacionada a alguns fatores de patogenicidade e virulência (DE JESUS *et al.*, 2002). Isolados clínicos frescos exibem uma maior atividade da enzima NTPDase quando comparados à isolados cultivados em laboratório por longos períodos de tempo, indicando assim, a participação dessa ectonucleotidase na virulência de *T. vaginalis* (TASCA *et al.*, 2005).

A enzima E-5N que está presente na superfície externa do *T. vaginalis* já foi caracterizada no parasito por TASCA *et al.*, 2003. A enzima exibe uma atividade hidrolítica preferencialmente maior por AMP, não dependendo de cátions divalentes, porém apresentando aumento da hidrólise na presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} (TASCA *et al.*, 2003). Assim como a NTPDase, a E-5N também pode estar envolvida nos mecanismos de patogenicidade, uma vez que isolados clínicos frescos cultivados em meio enriquecido com ferro, apresentam uma atividade aumentada desta enzima (TASCA *et al.*, 2005). Já foi relatado por

ALDERETE *et al.*, 1995; 2004, que o ferro é modulador de fatores de virulência, como adeninas e proteases. Além disso, altas taxas de crescimento dos trofozoítos ocorrem em altas concentrações de ferro, podendo resultar em uma resposta inflamatória do hospedeiro e esse efeito pode ser contrabalanceado pelo efeito antiinflamatório da adenosina gerada pela hidrólise de AMP à adenosina pela E-5N (TASCA *et al.*, 2005).

Fatores ambientais podem influenciar na atividade das ectonucleotidases em *T. vaginalis*. Em experimentos com trofozoítos cultivados sob limitação de soro se viu a ativação profunda das atividades de NTPDase e E-5N (FRASSON *et al.*, 2012a). O soro é importante fonte de nutrientes, principalmente adenosina, que é essencial para a sobrevivência do parasito (TASCA *et al.*, 2005; FRASSON *et al.*, 2012a). Também foi investigado o perfil de hidrólise relacionado à guanina em trofozoítos de *T. vaginalis*, onde foi avaliado o perfil de consumo de nucleotídeos e captação de guanosina em condição de limitação de soro. Os resultados mostram que nucleotídeos de guanina foram substratos para ectonucleotidases. Além disso, a condição de limitação de soro aumentou as atividades de E-NTPDase e E-5N. Sendo assim, a atividade das ectonucleotidases é influenciada pelos nutrientes essenciais que são importantes na manutenção da infecção (MENEZES *et al.*, 2016).

Outra enzima importante é a ADA que regula os níveis de adenosina extracelular em conjunto com a E-5N. Já foi relatada a ausência ou pouca atividade de ADA (MINOTTO *et al.*, 1998). No entanto, adenosina é o precursor primário do *pool* de nucleotídeos de purinas em *T. vaginalis*, visto que o protozoário não realiza a síntese *de novo*, dependendo das vias de captação (MUNAGALA e WANG, 2003). Weizenmann *et al.*, 2011 realizaram a caracterizaram ADA. Utilizaram trofozoítos intactos de *T. vaginalis* e os resultados sugerem que a atividade desta enzima pode estar envolvida no processo inflamatório, visto que o ATP extracelular é pró-inflamatório, enquanto a adenosina apresenta um efeito anti-inflamatório. Além disso, o ATP estimula neutrófilos a liberarem óxido nítrico (NO) e adenosina inibe essa secreção, colaborando assim com a evasão do sistema imune (TASCA *et al.*, 2005).

II.4.2 ATP e adenosina

O ATP está presente em todas as células e tem seu papel metabólico bem estabelecido. Os nucleotídeos extracelulares como o ATP podem funcionar como moléculas de sinalização endógenas que controlam a inflamação e as respostas imunes (DI VIRGILIO, 2003; IDZKO, 2014). O papel do ATP na imunidade está relacionado com a sua hidrólise até o nucleosídeo adenosina. A adenosina possui a função de sinalização da inflamação e de resposta imune, fornecendo um sinal protetor de tecido com feedback negativo (BOURS, 2006; IDZKO, 2014).

Os efeitos do ATP e da adenosina extracelulares quando regulados pelos receptores purinérgicos tem uma importante função nas reações inflamatórias e imunológicas. As concentrações de ATP no plasma são normalmente muito baixas (400-700 nM) enquanto sua concentração intracelular é alta (3 a 10 mM). Em comparação com a adenosina (40-80 nM), ATP possui concentração cerca de dez vezes mais alta; no entanto, estas concentrações podem aumentar extracelularmente sob várias condições (BOURS, 2006).

O aumento dos níveis extracelulares de ATP decorrente de danos teciduais constitui um sinal de perigo e desencadeia funções pró-inflamatórias dos neutrófilos, iniciando assim uma resposta primária (BOURS, 2006; IDZKO, 2014). O ATP se liga aos receptores P2 e promove o recrutamento de macrófagos, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e linfócitos B e aumentando a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Em neutrófilos a adenosina extracelular é capaz de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio e produção de citocinas, além disso, pode inibir a produção de IL-12 e TNF- α por macrófagos (JUNGER, 2008; BHARDWAJ e SKELLY, 2009; GOMES *et al.*, 2015). Os efeitos do sistema purinérgico na produção de óxido nítrico NO por neutrófilos estimulados com *T. vaginalis* foi investigado, e os resultados mostram que principalmente a enzima E-5N está envolvida na produção de NO. ATP e ADP não alteraram a produção de NO, ao contrário da adenosina e inosina que reduziram a produção de NO, através da ativação do receptor A2A, favorecendo o parasitismo. Esses resultados também permitem a melhor compreensão da interação parasito-hospedeiro (FRASSON *et al.*, 2012b). FRASSON *et al.*, 2017 também investigaram o envolvimento da sinalização purinérgica na produção de espécies

reativas de oxigênio (ROS) e IL-8 por neutrófilos estimulados por *T. vaginalis*. Os resultados mostram que os parasitas foram capazes de induzir um aumento nos níveis de ROS e IL-8; no entanto, quando os neutrófilos estimulados por *T. vaginalis* foram incubados com adenosina e inibidor ADA, os níveis de ROS e IL-8 foram significativamente reduzidos.

II.4.3. Transporte de nucleosídeos e inibidores

Os nucleosídeos são moléculas hidrofílicas e o seu transporte através da membrana celular se dá através de transportadores de nucleosídeos (NT), esse processo do metabolismo é crucial para protozoário que não realizam síntese *de novo* de purinas (PARKINSON *et al.*, 2011).

A regulação de adenosina extracelular é feita através de transportadores que possuem um papel essencial de carrear esse nucleosídeo através de membranas celulares (NOJI *et al.*, 2004). A presença de transportadores de nucleosídeos foi vista no sistema nervoso central, onde estão subdivididos em duas subclasses principais, concentrativa (CNTs, dependente de sódio) e equilibrativa (ENTs, independente de sódio) (PAES-DE-CARVALHO, 2002). Em células mamíferas é possível observar que os ENTs facilitam a liberação celular de adenosina e a ativação dos seus receptores (PARKINSON *et al.*, 2011).

Transportadores de purinas já foram identificados em vários protozoários. Métodos com purinas e pirimidinas radiomarcadas eram utilizados para medir o transporte desses nucleosídeos. O avanço nas técnicas de clonagem e a expressão heteróloga permitiu a caracterização de transportadores de nucleosídeos de protozoários isolados pela primeira vez em 2005 (DE KONING *et al.*, 2005). Foi possível caracterizar transportadores de nucleosídeos de *Leishmania donovani* (VASUDEVAN *et al.*, 1998; CARTER *et al.*, 2000), *Trypanosoma brucei brucei* (SANCHEZ *et al.*, 1999; MÄSER *et al.*, 1999), *Toxoplasma gondii* (CHIANG *et al.*, 1999) e *Plasmodium falciparum* (CARTER *et al.*, 2000; PARKER *et al.*, 2000). Os primeiros transportadores de nucleobase foram clonados de *T. brucei brucei* e se descobriu que pertenciam à família de transportadores de nucleosídeos equilibrativos (ENT), até o presente momento se sabe que todos os transportadores de nucleosídeos de protozoários

pertencem a esta mesma família (DE KONING *et al.*, 2005). Foi mostrada através de adenosina radiomarcada em *T. brucei brucei* e *Trypanosoma congolense*, que a taxa de captação de adenosina era maior. Pouco se sabe sobre os transportadores de nucleosídeos em *T. vaginalis* (DE KONING *et al.*, 2005). *T. vaginalis* pode conter dois transportadores separados para o transporte de adenosina, guanosina e uridina. Ambos os transportadores teriam mais de um local de ligação de nucleosídeo, o primeiro possuindo locais para nucleosídeos de adenosina e pirimidina, enquanto o segundo teria um local de adenosina e uridina e um local de guanosina separado (HARRIS *et al.*, 1998).

Inibidores de transportadores de nucleosídeos podem ser utilizados em uma gama de doenças, como câncer e até mesmo doenças causadas por vírus de RNA. Eles também podem ser utilizados em doenças parasitárias visto que a maioria dos parasitos dependem da captação de nucleosídeos de purina e nucleobases do hospedeiro para a síntese desses metabólitos (KING *et al.*, 2006). Foram identificados em *P. falciparum* uma série de análogos nucleosídeos como nitrobenzylthioinosine (NBMPR) e nitrobenzyltioguanosina (NBTGR), e compostos não nucleosídeos, que inibem potentemente hENT1 (BALDWIN *et al.*, 2007). Em *T. vaginalis* transportadores de purina e pirimidina também são considerados potenciais alvos (HEYWORTH *et al.*, 1982; HEYWORTH *et al.*, 1984). Dados do nosso grupo mostraram que a captação de guanosina foi menor do que a observada para adenosina, demonstrando que a guanosina não é o nucleosídeo preferencial para *T. vaginalis* (MENEZES, 2016). A guanosina/adenosina/citidina nucleosídeo hidrolase (GACNH) é regulada positivamente sob condições limitantes de glicose, mimetizando aquelas que ocorrem durante o estabelecimento da infecção. O GACNH foi avaliada e sete compostos foram identificados com valores de IC₅₀ inferiores a 20 µM (ALAM *et al.*, 2018).

Um dos inibidores mais comumente usados é o dipiridamol (Fig. 4.A), que é um inibidor do transporte de nucleosídeos e um medicamento inibidor de fosfodiesterase 3 (PDE3) que inibe a formação de coágulos sanguíneos (DAVID *et al.*, 2012). Em altas concentrações o dipiridamol é capazes de inibir o transporte de nucleosídeos (CHIANG *et al.*, 1999). Em *Toxoplasma gondii* o dipiridamol inibiu a captação de D-adenosina em 63% e L-adenosina em 70%. Em *L. major* o dipiridamol não foi capaz de inibir o transportador LmNBT1. (AL

SAFARJALANI *et al.*, 2003). O dipiridamol em 10 μ M inibiu o crescimento de *P. falciparum* através da inibição de captação de adenina mediada por PfENT4 e PvENT4 (FRAME *et al.*, 2012). Outros trabalhos do mesmo grupo mostram que PfENT1 é insensível ao dipiridamol e que os transportadores PfENT1, PfENT4 e PvENT4 não são inibidos por NBMPR. Em *P. vivax* dipiridamol inibiu o transportador PvENT1 com um IC₅₀ de 40 μ M (DENISKIN *et al.*, 2016).

Assim como dipiridamol, o dilazep (Fig. 4.B), que é um vasodilatador, também atua como um inibidor da recaptação da adenosina (EL KOUNI *et al.*, 2003). Como o transportador de *P. falciparum* PfNT1 não é específico, pois é capaz de transportar tanto L-enantiômeros quanto D-enantiômeros não é inibido pelo dilazep (PARKER *et al.*, 2000). Além de *P. falciparum*, os transportadores de nucleotídeos de *L. major*, *T. brucei brucei* e esquistossomose onó foram inibidos por dilazep (EL KOUNI *et al.*, 1991; DE KONING *et al.*, 1997; AL-SALABI *et al.*, 2003). Nenhum dos dois transportadores de *T. vaginalis* é inibido completamente por dilazep em concentrações que inibem os transportadores em células de mamíferas. Essa inibição não competitiva significa que o dilazep está agindo em local diferente do transporte/ligação de adenosina (HARRIS *et al.*, 1988).

O alopurinol (Fig. 4.C), é um análogo estrutural da hipoxantina e é um inibidor seletivo da biossíntese de ácido úrico, inibindo a xantina-oxidase, a enzima que cataliza a conversão da hipoxantina em xantina e a conversão da xantina em ácido úrico, sendo utilizado para o tratamento da gota. Além disso, alopurinol já foi testado contra *Trypanosoma cruzi*, apresentando resultados moderados devido as diferenças marcantes entre os diferentes isolados (URBINA, 2001), *Trypanosoma brucei* (AL-SALABI *et al.*, 2003) e *L. braziliensis panamensis* (SAENZ *et al.*, 1989). O alopurinol é um substrato para o transportador de nucleobase LmNBT1 em *L. major* (AL-SALABI *et al.*, 2003).

Considerando a alta prevalência e o impacto da tricomoníase na saúde pública, além da necessidade de compreender a relação parasito-hospedeiro, se faz necessária a investigação de novos alvos terapêuticos com foco no papel dos nucleotídeos e nucleosídeos na inflamação e no estabelecimento da infecção de *T. vaginalis*.

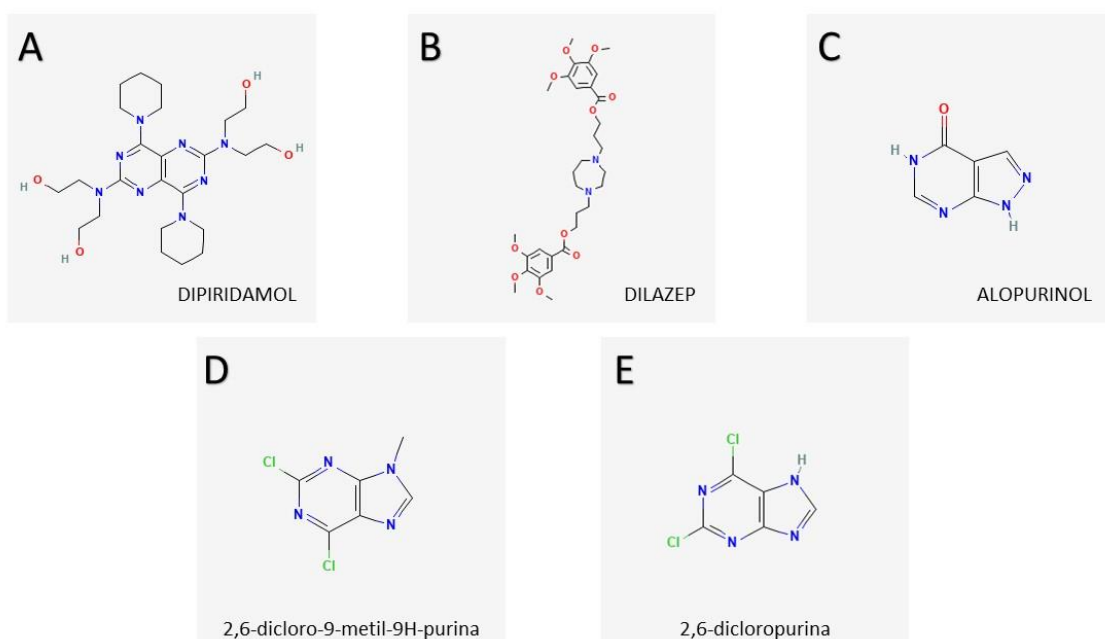


Figura 4: Estruturas químicas dos inibidores do transporte de adenosina, dilazep e dipiridamol; alopurinol, inibidor da xantina oxidase; e dos compostos análogos a adenosina 2,6-dicloro-9-metil-9H-purina e 2,6-dicloropurina. A. Dipiridamol; B. Dilazep; C. Alopurinol; D. 2,6-dicloro-9-metil-9H-purina; E. 2,6-dicloropurina.

III. OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo geral deste estudo foi investigar o papel do nucleosídeo adenosina na sobrevivência de *T. vaginalis* investigando a participação de inibidores da recaptação de adenosina como possível novo alvo terapêutico.

Objetivos específicos:

1. Realizar revisão bibliográfica sobre o atual estado da arte do papel da sinalização purinérgica na relação *T. vaginalis*-hospedeiro;
2. Avaliar o perfil das enzimas NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis* em condição de limitação de soro bovino adulto em isolados clínicos frescos de *T. vaginalis*;
3. Avaliar a viabilidade de *T. vaginalis* frente aos compostos 2,6-dicloro-9-metil-9H-purina e 2,6-dicloropurina, aos inibidores de recaptação de adenosina dilazep e dipiridamol e também frente ao alopurinol;
4. Avaliar o efeito do inibidor dipiridamol na expressão gênica de transportador de nucleosídeos de *T. vaginalis*.

The Role of Purinergic Signaling in *Trichomonas vaginalis* Infection

Micheli Ferla and Tiana Tasca

O capítulo I é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 39 – 50.

Ferla M, Tasca T. The Role of Purinergic Signaling in *Trichomonas vaginalis* Infection. Curr Top Med Chem. 2021;21(3):181-192. doi: 10.2174/1568026620999200904122212. PMID: 32888270.

The adenosine uptake inhibitor dipyridamole reduces *Trichomonas vaginalis* growth and shows synergism with metronidazole

Micheli Ferla and Tiana Tasca

*O texto completo do capítulo II, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 52 -91, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da investigação do papel do nucleosídeo adenosina na sobrevivência de **T. vaginalis** buscando inibidores da recaptação de adenosina como possível novo alvo terapêutico.*

V. DISCUSSÃO GERAL

Tricomoníase é a IST não viral mais comum no mundo, e está associada no aumento da suscetibilidade a aquisição e transmissão do HIV (FIGUEROA-ANGULO *et al.*, 2012). Devido à falta de recursos de diagnóstico em diversos lugares do mundo e também à inexistência de dados de vigilância, os dados sobre essa doença se tornam subestimados (ROWLEY, 2019). A infecção é causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis* que habita o trato urogenital humano, possuindo apenas dois fármacos aprovados pelo FDA, metronidazol e tinidazol (KULDA *et al.*, 1999). Cerca de 9,6 % dos isolados apresenta resistência frente aos fármacos (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). Considerando a alta prevalência da tricomoníase, a falha no tratamento (CONRAD *et al.* 2012) e o fato de ser um problema de saúde pública, a busca por alternativas terapêuticas com foco em novos alvos se torna essencial para o combate dessa infecção.

Na busca de novos alvos terapêuticos, o entendimento da relação parasito-hospedeiro se torna essencial. A pesquisa dos aspectos fisiológicos e bioquímicos permite entender a biologia do parasito, facilitando assim a prospecção de alvos que atuem especificamente sobre o microorganismo (MANSOUR, 2002). Sendo assim, o capítulo 1 dessa dissertação teve como objetivo fazer uma revisão resumindo sobre a contribuição da sinalização purinérgica para a patogênese dos tricomonas, com foco na busca por compostos anti-*T. vaginalis*, com estudos sobre produtos naturais e compostos sintéticos, e investigação de novos alvos terapêuticos.

O sistema purinérgico é uma rede de sinalização celular e se apresenta como uma via de investigação que vem sendo estudada em diversos organismos, colaborando no entendimento do estabelecimento da infecção assim como influencia funções essenciais do organismo (BURNSTOCK, 2014; SANSOM *et al.*, 2008). Após a liberação de nucleotídeos para o espaço extracelular as enzimas responsáveis pela sua degradação, chamadas ectonucleotidases, regulam as concentrações extracelulares de nucleotídeos/nucleosídeos (SANSOM *et al.*, 2008; ZIMMERMANN, 2001). Esses nucleotídeos então se ligam aos receptores chamados purinoceptores cuja ativação altera a função imune celular (BURNSTOCK, 2014). As ectonucleotidases apresentam um papel importantíssimo no metabolismo, visto que hidrolisam ATP até a produção de adenosina, sendo essencial para sobrevivência de parasitos que são incapazes de realizar a síntese *de novo* de

purinas e pirimidinas, possibilitando que o nucleosídeo formado seja recaptado e incorporado ao metabolismo (HEYWORTH *et al.*, 1982; 1984). A sinalização purinérgica se inicia pela liberação intracelular do ATP para o meio extracelular, sua ligação ao receptor ativa a produção de citocinas por células imunes e o recrutamento dessas células (BOURS *et al.*, 2006). O ATP é hidrolisado à adenosina, e a adenosina desencadeia efeitos antiinflamatórios através da ação em receptores. ATP e adenosina também desempenham um papel importantíssimo na sinalização da infecção, ou seja, ATP e a adenosina exercem funções opostas (BURNSTOCK, 1976). Portanto, a investigação do sistema purinérgico em parasitos auxilia na compreensão de seus aspectos bioquímicos, a relação com o hospedeiro e facilita a compreensão para modulação de novos alvos.

Em *T. vaginalis*, o sistema purinérgico desempenha um papel fundamental na sobrevivência do parasito, visto que depende das vias de salvação, ou seja, não são capazes de realizar a sintetizar de novo de nucleotídeos de purina e pirimidina (HEYWORTH *et al.*, 1982; 1984). As ectonucleotidases, NTPDase e E-5N, além da adenosina desaminase (ADA), atuam no suporte e na modulação da infecção, pois o ATP possui papel papel pró-inflamatório e sua hidrólise até adenosina, que atua como sinal anti-inflamatório, favorece a sobrevivência do parasito (FRASSON *et al.*, 2012a; GOUNARIS e SELKIK, 2005). Ainda, a adenosina tem um papel primordial no metabolismo de purinas pois é considerada o precursor de todos os nucleotídeos (MUNAGALA e WANG, 2003).

Diante do contexto e da importância do sistema purinérgico na investigação da relação parasito-hospedeiro e do entendimento dos mecanismos de infecção, o capítulo 2 dessa dissertação abordou a investigação do efeito da restrição de soro bovino adulto na atividade das ectonucleotidases de *T. vaginalis*. Visto que a limitação de soro no meio de cultivo promove uma situação de privação de adenosina, foram utilizados três isolados clínicos frescos (TV-LACM11, TV-LACM15 e TV-LACM22) para traçar uma comparação de perfil enzimático. Dados do nosso grupo já demonstram que a privação de soro promove um aumento da taxa de hidrólise de nucleotídeos pelas ectonucleotidases em isolado padrão (ATCC30236) (FRASSON *et al.*, 2012a).

O perfil de crescimento dos trofozoítos nas condições de restrição de soro (1,0% HIBS) em comparação com a suplementação habitual (10% HIBS) foi avaliado em curva cinética de crescimento. Conforme esperado, no grupo controle cultivado em 10% de soro, os trofozoítos mantiveram a sua morfologia e viabilidade, e também exibiram um crescimento normal dentro do período de 48 horas. Já em restrição de soro os parasitos apresentaram uma diminuição no seu crescimento nas primeiras horas de incubação. Isolados clínicos têm maior capacidade de adaptação em condições de mudança de ambiente, visto que, o ambiente que se encontram na vagina sofre constantes variações devido ao ciclo hormonal, apresentando um sítio de infecção complexo (LEHKER e ALDERETE, 2000; FIGUEROA-ANGULO *et al.*, 2012). Em contraste, parasitos mantidos em meio de cultivo suplementado com soro não conseguem permanecer viáveis no ambiente vaginal (LEHKER e ALDERETE, 1990).

Após estabelecer o padrão de crescimento dos isolados clínicos em restrição de soro, passamos a investigar o perfil enzimático das ectonucleotidases, NTPDase e E-5N de *T. vaginalis* sob essa condição. O cultivo do parasito é feito tradicionalmente com meio suplementado com soro bovino adulto, que é considerado fonte de adenosina para o crescimento do trofozoíto. Em estudos anteriores nosso grupo já demonstrou que a hidrólise dos nucleotídeos foi maior nos parasitos mantidos a 1,0% de soro (FRASSON *et al.*, 2012a). A hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, respectivamente, foi significativamente maior em todos os isolados clínicos frescos mantidos a 1,0% de soro quando comparados ao grupo controle (trofozoítos cultivados em condição normal a 10% de soro). Esses dados corroboram com estudos anteriores (DE JESUS *et al.*, 2002; TASCA *et al.*, 2005; FRASSON *et al.*, 2012a). A enzima NTPDase exibiu maior taxa hidrólise de ATP e ADP em relação a E-5N, que apresentou taxa inferior a hidrólise de AMP, isso se deve ao fato da atividade da NTPDase ter uma possível associação com a virulência de *T. vaginalis*. O sistema purinérgico é uma das principais fontes de produção de adenosina para garantir o crescimento dos trofozoítos e assim assegurar o estabelecimento da infecção. Os resultados da curva cinética de crescimento e a atividade enzimática das ectonucleotidases demonstram um papel importante das enzimas na condição de restrição de adenosina.

A adenosina é transportada através das membranas celulares por transportadores de nucleosídeos que desempenham um papel fundamental na regulação das concentrações extracelulares de adenosina. Os inibidores da captação de adenosina disponíveis são seletivos para os transportadores de nucleotídeos. (NOJI *et al.*, 2004). Com o intuito de investigar o transporte de adenosina, utilizamos inibidores do seu transporte e avaliamos a viabilidade dos trofozoítos. Num primeiro momento avaliamos a viabilidade dos trofozoítos frente aos compostos 2,6-dicloro-9-metil-9H-purina e 2,6- dicloropurina e analisamos a sua atividade nas condições de restrição de soro bovino adulto (1,0% HIBS) e também em condições normais de suplementação (10% HIBS). O análogo de adenosina 2,6-dicloro-9-metil-9H-purina não causou prejuízo pronunciado na viabilidade de *T. vaginalis* em condição 1,0% HIBS e condição 10% HIBS para isolados ATCC30236, TV-LACM11, TV-LACM15 e TV-LACM22, respectivamente. Os resultados para o análogo 2,6-dicloropurina também não revelaram nenhuma atividade anti-*T. vaginalis* em 1,0% HIBS e em 10% HIBS para os mesmos respectivos isolados.

Em um segundo momento realizamos uma curva cinética de crescimento a 1,0% de soro para analisarmos o comportamento dos isolados clínicos TV-LACM11, TV-LACM15 e TV-LACM22 e padrão ATCC30236 frente aos inibidores de transporte de adenosina já utilizados na literatura: dipiridamol e dilazep. Estabelecemos uma concentração de 1,0 mM para os isolados clínicos visto que os diferentes isolados apresentam uma eficiente adaptação às mudanças no ambiente, e para o isolado ATCC30236 estabelecemos uma concentração de 100 µM. Os dados da curva cinética de crescimento mostram que dipiridamol inibiu a proliferação dos trofozoítos dos isolados clínicos frescos (TV-LACM11, TV-LACM15 e TV-LACM22). Não foi observada inibição significativa na presença de dilazep em nenhum dos isolados. O efeito apresentado na associação dilazep com dipiridamol se deve ao efeito do dipiridamol. Já o isolado ATCC30236 apresentou uma maior viabilidade quando analisamos a incubação com apenas o dipiridamol em relação aos isolados clínicos, visto que sua concentração é diferente. E quando avaliamos dilazep e dipiridamol com dilazep podemos observar que a viabilidade dos trofozoítos é muito parecida com controle.

A adenosina é um nucleosídeo de purina que pode ser liberado por vários órgãos em diversas condições como hipóxia, trauma, dor, inflamação e sua demanda é aumentada quando há uma maior hidrólise de ATP (FREDHOLM *et al.*, 2001; LATINI e PEDATA, 2001). A demanda aumentada de adenosina garante a proteção do dano tecidual (RAVELIC e BURNSTOCK, 1998). A inibição da recaptção de adenosina através da inibição de seus transportadores pode ser um processo chave no desenvolvimento de novos fármacos (LINDEN, 2001), principalmente antiparasitários. Os transportadores de purinas já foram identificados em diversos protozoários, mas quando falamos de *T. vaginalis* pouco se sabe sobre transportadores (DE KONING *et al.*, 2005). Como os parasitos não são capazes de realizar a síntese *de novo* e as células do hospedeiro sim, essa é uma das diferenças entre ambos e se torna um potencial alvo para o desenvolvimento de novos fármacos. Sendo assim, os parasitos desenvolveram transportadores para a obtenção de purinas e pirimidinas que garantem a sua sobrevivência (CARTER *et al.*, 2000). Espécies de *Leishmania* expressam dois transportadores de purina, NT1 que captam adenosina e nucleosídeos de pirimidina (VASUDEVAN *et al.*, 1998) e NT2 que capta guanossina, inosina e xantossina (CARTER *et al.*, 2000). A restrição de fontes de purinas do meio de promastigotas de *L. major* induziu uma regulação positiva na expressão dos transportadores NT1. Também foi visto uma regulação positiva para os transportadores NT2, NT3 e NT4 mas em menor intensidade (ORTIZ *et al.*, 2010). Em *Trypanosoma brucei* o transportador TbNT2, se enquadra na classificação como P1, apresenta alta afinidade ao transporte de adenosina, inosina e guanossina (SANCHEZ *et al.*, 1999). O dipiridamol é utilizado como inibidor do transporte de nucleosídeo, mas quando falamos de dose oral para esta função é necessária uma alta dosagem (NOJI *et al.*, 2004).

Considerando a importância dos diversos fatores acima, decidimos avaliar a expressão do transportador TVAG_441760 em comparação com o gene de normalização de DNA topoisomerase II. Utilizamos o isolado clínico TV-LACM11 que foi previamente incubado em restrição de soro (1,0% HIBS), onde a disponibilidade da adenosina está limitada. Além disso, os trofozoítos foram tratados em 2 e 4h em duas concentrações (0,5 e 1,0 mM) do inibidor do transporte de adenosina dipiridamol. Nossos dados mostram um aumento da expressão do transportador ao longo do tempo, tanto em 1,0 mM quanto em 0,5

mM nos dois momentos (2 e 4h). Esses resultados mostram que a limitação de adenosina aumenta a expressão do transportador de transporte da mesma já que a adenosina é essencial para a sobrevivência do parasito.

A fim de analisar a associação entre metronidazol e dipiridamol, foi realizado ensaio de *checkerboard*, onde várias concentrações destes compostos foram testadas em conjunto. Assim, foi observada ação sinérgica quando utilizado metronidazol ($\geq 4.56 \mu\text{M}$) e dipiridamol ($\geq 1,0 \text{ mM}$) concomitantemente. Esse resultado indica que dipiridamol e metronidazol agem por vias diferentes, tornando possível a utilização de administração de doses mais baixas devido ao efeito sinérgico. Além disso, com doses menores se espera a redução de efeitos adversos gerados por esses fármacos, visto que para administração oral de dipiridamol necessitaria de doses maiores (NOJI *et al.*, 2004), e também uma possível contribuição para evitar mecanismos de resistência que já são vistos na administração de metronidazol.

A limitação de soro aumenta a atividade enzimática das ectonucleotidases. Além disso, também aumenta a expressão gênica do transportador indicando uma modulação pela restrição de adenosina. Nossos achados mostram que os parasitos cultivados com limitação de soro tiveram a atividade dos transportadores de nucleotídeos afetada.

Finalmente, a abordagem desta dissertação permitiu a avaliação de importantes aspectos da influência da restrição de soro na atividade das ectonucleotidases. Além da avaliação da influência dos inibidores do transporte de adenosina, colaborando para o melhor entendimento do sistema purinérgico em *T. vaginalis*. Os achados aqui apresentados trazem contribuições sobre o metabolismo dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares de *T. vaginalis*, e esses resultados ampliam as possibilidades na busca de novas alternativas terapêuticas.

VI. CONCLUSÕES

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

1. A revisão bibliográfica atualizou os dados sobre a sinalização purinérgica envolvida na biologia do *T. vaginalis* e na interação com células hospedeiras, com foco na caracterização de ecto-nucleotidases e nas vias de recuperação de purina. As implicações dos produtos finais, os nucleosídeos adenosina e guanosina, para a resposta dos neutrófilos humanos e o dano às células epiteliais vaginais revelam a sinalização purinérgica como um novo mecanismo potencial para alvos alternativos;
2. O cultivo de *T. vaginalis* em uma condição de limitação de soro bovino, com diminuída oferta de adenosina aumentou a atividade das enzimas NTPDase e E-5N;
3. A limitação de soro bovino na presença de inibidores do transporte de adenosina diminuiu a viabilidade de *T. vaginalis*;

O inibidor de recaptção de adenosina, dipiridamol, inibiu o crescimento de *T. vaginalis* e causou um aumento da expressão gênica do transportador de nucleosídeos, indicando inibição do transporte de adenosina e sugerindo assim, um potencial novo alvo terapêutico

VII. PERSPECTIVAS

A continuidade dos estudos acerca do envolvimento da restrição de soro na sinalização purinérgica a infecção por *T. vaginalis* permite algumas perspectivas:

- Análise da expressão gênica de transportadores de adenosina em isolados clínicos frescos de *T. vaginalis* tratados em restrição de soro bovino na presença de inibidores do transporte de adenosina;
- Determinação da recaptação de adenosina através de espectrometria de massa com razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotópica

VIII. REFERÊNCIAS

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., ... & Weisman, G. A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews*, 58(3), 281-341.
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., & Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences*, 32(1), 19-29.
- Al Safarjalani, O. N., Naguib, F. N., & El Kouni, M. H. (2003). Uptake of nitrobenzylthioinosine and purine β -L-nucleosides by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(10), 3247-3251.
- Alam, R., Barbarovich, A. T., Caravan, W., Ismail, M., Barskaya, A., Parkin, D. W., & Stockman, B. J. (2018). Druggability of the guanosine/adenosine/cytidine nucleoside hydrolase from *Trichomonas vaginalis*.
- Alderete, J. F., Nguyen, J., Mundodi, V., & Lehker, M. W. (2004). Heme-iron increases levels of AP65-mediated adherence by *Trichomonas vaginalis*. *Microbial pathogenesis*, 36(5), 263-271.
- Alderete, J. F. (1999). Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. *Infection and immunity*, 67(8), 4298-4302.
- Alderete, J. F., Millsap, K. W., Lehker, M. W., & Benchimol, M. (2001). Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cellular microbiology*, 3(6), 359-370.

- Alderete, J. F., Arroyo, R., & Lehker, M. W. (1995). [33] Analysis for adhesins and specific cytoadhesion of *Trichomonas vaginalis*. *Methods in enzymology*, 253, 407-414.
- Alessio, C., & Nyirjesy, P. (2019). Management of resistant trichomoniasis. *Current infectious disease reports*, 21(9), 1-7.
- Ali, V., & Nozaki, T. (2007). Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by “amitochondriate” protozoan parasites. *Clinical microbiology reviews*, 20(1), 164-187.
- Al-Salabi, M. I., Wallace, L. J., & De Koning, H. P. (2003). A *Leishmania major* Nucleobase Transporter Responsible for Allopurinol Uptake Is a Functional Homolog of the *Trypanosoma brucei* H2 Transporter. *Molecular pharmacology*, 63(4), 814-820.
- Alvarez-Sánchez, M. E., Carvajal-Gamez, B. I., Solano-González, E., Martínez-Benitez, M., Garcia, A. F., Alderete, J. F., & Arroyo, R. (2008). Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* cytotoxic CP65, a 65-kDa cysteine proteinase involved in cellular damage. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(11), 2442-2451.
- Arroyo, R., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A., & Alderete, J. F. (1993). Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Molecular microbiology*, 7(2), 299-309.
- Arroyo, R., Cárdenas-Guerra, R. E., Figueroa-Angulo, E. E., Puente-Rivera, J., Zamudio-Prieto, O., & Ortega-López, J. (2015). *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases: iron response in gene expression and proteolytic activity. *BioMed research international*, 2015.

- Bagheri, S., Saboury, A. A., & Haertlé, T. (2019). Adenosine deaminase inhibition. *International journal of biological macromolecules*, 141, 1246-1257.
- Baldwin, S. A., McConkey, G. A., Cass, C. E., & Young, J. D. (2007). Nucleoside transport as a potential target for chemotherapy in malaria. *Current pharmaceutical design*, 13(6), 569-580.
- Beach, D. H., Holz Jr, G. G., Singh, B. N., & Lindmark, D. G. (1990). Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and biochemical parasitology*, 38(2), 175-190.
- Benchimol, M. (2004). Trichomonads under microscopy. *Microscopy and microanalysis*, 10(5), 528-550.
- Bhardwaj, R., & Skelly, P. J. (2009). Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface?. *Trends in parasitology*, 25(6), 256-260.
- Bours, M. J. L., Swennen, E. L. R., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N., & Dagnelie, P. C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & therapeutics*, 112(2), 358-404.
- Bradic, M., & Carlton, J. M. (2018). Does the common sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis* have sex?. *PLoS pathogens*, 14(3), e1006831.
- Braun, N., Zhu, Y., Krieglstein, J., Culmsee, C., & Zimmermann, H. (1998). Upregulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *Journal of Neuroscience*, 18(13), 4891-4900.

- Bruins, M. J., van Straaten, I. L., & Ruijs, G. J. (2013). Respiratory disease and *Trichomonas vaginalis* in premature newborn twins. *The Pediatric infectious disease journal*, 32(9), 1029-1030.
- Burnstock, G., Satchell, D. G., & Smythe, A. (1972). A comparison of the excitatory and inhibitory effects of non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species. *British journal of pharmacology*, 46(2), 234-242.
- Burnstock, G. (1976). Purinergic receptors. *Journal of theoretical biology*, 62(2), 491-503.
- Burnstock, G. (2006). Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacological reviews*, 58(1), 58-86.
- Burnstock, G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological reviews*.
- Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling. *British journal of pharmacology*, 147(S1), S172-S181b.
- Burnstock, G. (2014). Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Experimental physiology*, 99(1), 16-34.
- Carter, N. S., Drew, M. E., Sanchez, M., Vasudevan, G., Landfear, S. M., & Ullman, B. (2000). Cloning of a Novel Inosine-Guanosine Transporter Gene from *Leishmania donovani* by Functional Rescue of a Transport-deficient Mutant. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20935-20941.
- Chapin, K., & Andrea, S. (2011). APTIMA® *Trichomonas vaginalis*, a transcription-mediated amplification assay for detection of *Trichomonas vaginalis* in urogenital specimens. *Expert review of molecular diagnostics*, 11(7), 679-688.

- Chesson, H. W., Blandford, J. M., & Pinkerton, S. D. (2004). Estimates of the annual number and cost of new HIV infections among women attributable to trichomoniasis in the United States. *Sexually transmitted diseases*, 31(9), 547-551.
- Chiang, C. W., Carter, N., Sullivan, W. J., Donald, R. G., Roos, D. S., Naguib, F. N., ... & Wilson, C. M. (1999). The Adenosine Transporter of *Toxoplasma gondii*: identification by insertional mutagenesis, cloning, and recombinant expression. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 35255-35261.
- Conrad, M. D., Gorman, A. W., Schillinger, J. A., Fiori, P. L., Arroyo, R., Malla, N., ... & Carlton, J. M. (2012). Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(3), e1573.
- Cudmore, S. L., Delgaty, K. L., Hayward-McClelland, S. F., Petrin, D. P., & Garber, G. E. (2004). Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 783-793.
- Curlin, M., & Bursac, D. (2013). Cervical mucus: from biochemical structure to clinical implications. *Front Biosci (Schol Ed)*, 5, 507-15.
- David, A. W. (2012). Foyes principles of medicinal chemistry.
- de Brum Vieira, P., Tasca, T., & Evan Secor, W. (2017). Challenges and persistent questions in the treatment of Trichomoniasis. *Current topics in medicinal chemistry*, 17(11), 1249-1265.
- de Carli, G.A.; Tasca, T. *Trichomonas*. *Parasitologia Humana*. 13^a ed., pp 125-131, 2016.

- de Jesus, J. B., de Sá Pinheiroa, A. A., Lopes, A. H., & Meyer-Fernandes, J. R. (2002). An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(9-10), 890-896.
- De Koning, H. P., Bridges, D. J., & Burchmore, R. J. (2005). Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: from biology to therapy. *FEMS microbiology reviews*, 29(5), 987-1020.
- De Koning, H. P., & Jarvis, S. M. (1997). Hypoxanthine Uptake through a Purine-Selective Nucleobase Transporter in Trypano Soma Brucei Brucei Procyclic Cells is Driven by Protonmotive Force. *European journal of biochemistry*, 247(3), 1102-1110.
- Deniskin, R., Frame, I. J., Sosa, Y., & Akabas, M. H. (2016). Targeting the Plasmodium vivax equilibrative nucleoside transporter 1 (PvENT1) for antimalarial drug development. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6(1), 1-11.
- Di Virgilio, F. (2003). Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target. *British journal of pharmacology*, 140(3), 441-443.
- Dunne, R. L., Linda, A. D., Upcroft, P., O'donoghue, P. J., & Upcroft, J. A. (2003). Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell research*, 13(4), 239-249.
- Edwards, T., Burke, P., Smalley, H., & Hobbs, G. (2016). *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. *Critical reviews in microbiology*, 42(3), 406-417.
- el Kouni, M. H. (1991). Efficacy of combination therapy with tubercidin and nitrobenzylthioinosine 5'-monophosphate against chronic and advanced stages of schistosomiasis. *Biochemical pharmacology*, 41(5), 815-820.

- el Kouni, M. H. (2003). Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacology & therapeutics*, 99(3), 283-309.
- Falk, S., Uldall, M., & Heegaard, A. M. (2012). The role of purinergic receptors in cancer-induced bone pain. *Journal of osteoporosis*, 2012.
- Fichorova, R. N., Trifonova, R. T., Gilbert, R. O., Costello, C. E., Hayes, G. R., Lucas, J. J., & Singh, B. N. (2006). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infection and immunity*, 74(10), 5773-5779.
- Fichorova, R. N. (2009). Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *Journal of reproductive immunology*, 83(1-2), 185-189.
- Figuerola-Angulo, E. E., Rendón-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Calla-Choque, J. S., Cárdenas-Guerra, R. E., Ortega-López, J., ... & Arroyo, R. (2012). The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and infection*, 14(15), 1411-1427.
- Frame, I. J., Merino, E. F., Schramm, V. L., Cassera, M. B., & Akabas, M. H. (2012). Malaria parasite type 4 equilibrative nucleoside transporters (ENT4) are purine transporters with distinct substrate specificity. *Biochemical Journal*, 446(2), 179-190.
- Franco, R., Casadó, V., Ciruela, F., Saura, C., Mallol, J., Canela, E. I., & Lluís, C. (1997). Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Progress in neurobiology*, 52(4), 283-294.
- Frasson, A. P., Menezes, C. B., Goelzer, G. K., Gnoatto, S. C. B., Garcia, S. C., & Tasca, T. (2017). Adenosine reduces reactive oxygen species and interleukin-8 production by *Trichomonas vaginalis*-stimulated neutrophils. *Purinergic signalling*, 13(4), 569-577.

- Frasson, A. P., Charão, M. F., Rosemberg, D. B., Souza, A. P. D., Garcia, S. C., Bonorino, C., ... & Tasca, T. (2012). Analysis of the NTPDase and ecto-5'-nucleotidase profiles in serum-limited *Trichomonas vaginalis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107, 170-177a.
- Frasson, A. P., De Carli, G. A., Bonan, C. D., & Tasca, T. (2012). Involvement of purinergic signaling on nitric oxide production by neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Purinergic signalling*, 8(1), 1-9b.
- Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., & Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological reviews*, 53(4), 527-552.
- Fredholm, B. B. (2011). Physiological and pathophysiological roles of adenosine. *Sleep and Biological Rhythms*, 9(1), 24-28.
- Garcia, A. F., Chang, T. H., Benchimol, M., Klumpp, D. J., Lehker, M. W., & Alderete, J. F. (2003). Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular microbiology*, 47(5), 1207-1224.
- Gilbert, R. O., Elia, G., Beach, D. H., Klaessig, S., & Singh, B. N. (2000). Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. *Infection and immunity*, 68(7), 4200-4206.
- Gomes, R. S., de Carvalho, L. C. F., de Souza Vasconcellos, R., Fietto, J. L. R., & Afonso, L. C. C. (2015). E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. *Microbes and infection*, 17(4), 295-303.

- Goodman, R. P., Ghabrial, S. A., Fichorova, R. N., & Nibert, M. L. (2011). Trichomonasvirus: a new genus of protozoan viruses in the family Totiviridae. *Archives of virology*, 156(1), 171-179.
- Gorrell, T. E. (1985). Effect of culture medium iron content on the biochemical composition and metabolism of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Bacteriology*, 161(3), 1228-1230.
- Gounaris, K., & Selkirk, M. E. (2005). Parasite nucleotide-metabolizing enzymes and host purinergic signalling. *Trends in parasitology*, 21(1), 17-21.
- Handa, M., & Guidotti, G. (1996). Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochemical and biophysical research communications*, 218(3), 916-923.
- Harp, D. F., & Chowdhury, I. (2011). Trichomoniasis: evaluation to execution. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 157(1), 3-9.
- Harris, D. I., Beechey, R. B., Linstead, D., & Barrett, J. (1988). Nucleoside uptake by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and biochemical parasitology*, 29(2-3), 105-116.
- Hernández-Gutiérrez, R., Avila-González, L., Ortega-López, J., Cruz-Talonia, F., Gómez-Gutierrez, G., & Arroyo, R. (2004). *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental parasitology*, 107(3-4), 125-135.
- Heyworth, P. G., Gutteridge, W. E., & Ginger, C. D. (1982). Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS letters*, 141(1), 106-110.

- Honigberg, B. M. (1990). Trichomonads found outside the urogenital tract of humans. In *Trichomonads Parasitic in Humans* (pp. 342-393). Springer, New York, NY.
- Idzko, M., Ferrari, D., & Eltzschig, H. K. (2014). Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, 509(7500), 310-317.
- James, D. M., & Born, G. V. R. (1980). Uptake of purine bases and nucleosides in African trypanosomes. *Parasitology*, 81(2), 383-393.
- Junger, W. G. (2008). Purinergic regulation of neutrophil chemotaxis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(16), 2528-2540.
- Kang, J. H., Song, H. O., Ryu, J. S., Shin, M. H., Kim, J. M., Cho, Y. S., ... & Min, D. Y. (2006). *Trichomonas vaginalis* promotes apoptosis of human neutrophils by activating caspase-3 and reducing Mcl-1 expression. *Parasite immunology*, 28(9), 439-446.
- King, A. E., Ackley, M. A., Cass, C. E., Young, J. D., & Baldwin, S. A. (2006). Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends in pharmacological sciences*, 27(8), 416-425.
- Kissinger, P., & Adamski, A. (2013). Trichomoniasis and HIV interactions: a review. *Sexually transmitted infections*, 89(6), 426-433.
- Knowles, A. F. (2011). The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. *Purinergic Signalling*, 7(1), 21-45.
- Krieger, J. N., & Rein, M. F. (1982). Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis*: in vitro studies and clinical implications. *Journal of infectious Diseases*, 146(3), 341-345.

- Kucknoor, A. S., Mundodi, V., & Alderete, J. F. (2005). Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* genes. *Infection and immunity*, 73(10), 6472-6478.
- Kulda, J. (1999). Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International journal for parasitology*, 29(2), 199-212.
- Latini, S., & Pedata, F. (2001). Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *Journal of neurochemistry*, 79(3), 463-484.
- Le, T. T. T., Berg, N. K., Harting, M. T., Li, X., Eltzschig, H. K., & Yuan, X. (2019). Purinergic signaling in pulmonary inflammation. *Frontiers in immunology*, 10, 1633.
- Lehker, M. W., & Alderete, J. F. (1990). Properties of *Trichomonas vaginalis* grown under chemostat controlled growth conditions. *Sexually Transmitted Infections*, 66(3), 193-199.
- Lehker, M. W., & Alderete, J. F. (2000). Biology of trichomonosis. *Current opinion in infectious diseases*, 13(1), 37-45.
- Lehker, M. W., & Sweeney, D. (1999). Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sexually Transmitted Infections*, 75(4), 231-238.
- Linden, J. (2001). Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41(1), 775-787.
- Mansour, T. E. (2002). The search for antiparasitic agents. *Chemotherapeutic targets in parasites: contemporary strategies*. Cambridge University Press, United Kingdom, 1-16.

- Mäser, P., Sütterlin, C., Kralli, A., & Kaminsky, R. (1999). A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance. *Science*, 285(5425), 242-244.
- de Aguiar Matos, J. A., Borges, F. P., Tasca, T., Bogo, M. R., De Carli, G. A., da Graça Fauth, M., ... & Bonan, C. D. (2001). Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6. 1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *International journal for parasitology*, 31(8), 770-775.
- Menezes, C. B., Frasson, A. P., Meirelles, L. C., & Tasca, T. (2017). Adenosine, but not guanosine, protects vaginal epithelial cells from *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity. *Microbes and infection*, 19(2), 122-131.
- Menezes, C. B., Durgante, J., de Oliveira, R. R., Dos Santos, V. H. J. M., Rodrigues, L. F., Garcia, S. C., ... & Tasca, T. (2016). *Trichomonas vaginalis* NTPDase and ecto-5'-nucleotidase hydrolyze guanine nucleotides and increase extracellular guanosine levels under serum restriction. *Molecular and biochemical parasitology*, 207(1), 10-18.
- Menezes, C. B., Frasson, A. P., & Tasca, T. (2016). Trichomoniasis-are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide?. *Microbial cell*, 3(9), 404.
- Mielczarek, E., & Blaszkowska, J. (2016). *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. *Infection*, 44(4), 447-458.
- Miller, M. R., & Nyirjesy, P. (2011). Refractory trichomoniasis in HIV-positive and HIV-negative subjects. *Current infectious disease reports*, 13(6), 595-603.
- Miller, R. L., & Lindstead, D. (1983). Purine and pyrimidine metabolizing activities in *Trichomonas vaginalis* extracts. *Molecular and biochemical parasitology*, 7(1), 41-51.

- Minotto, L., Ko, G. A., Edwards, M. R., & Bagnara, A. S. (1998). *Trichomonas vaginalis*: Expression and Characterisation of RecombinantS-Adenosylhomocysteinase. *Experimental parasitology*, 90(2), 175-180.
- Moodley, P., Connolly, C., & Sturm, A. W. (2002). Interrelationships among human immunodeficiency virus type 1 infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis, and the presence of yeasts. *The Journal of infectious diseases*, 185(1), 69-73.
- Moreno-Brito, V., Yáñez-Gómez, C., Meza-Cervantez, P., Ávila-González, L., Rodríguez, M. A., Ortega-López, J., ... & Arroyo, R. (2005). A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate: ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cellular microbiology*, 7(2), 245-258.
- Muller, M. (1988). Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annual Reviews in Microbiology*, 42(1), 465-488.
- Munagala, N. R., & Wang, C. C. (2003). Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and biochemical parasitology*, 127(2), 143-149.
- Noël, J. C., Fayt, I., Munoz, M. R. R., Simon, P., & Engohan-Aloghe, C. (2010). High prevalence of high-risk human papillomavirus infection among women with *Trichomonas vaginalis* infection on monolayer cytology. *Archives of gynecology and obstetrics*, 282(5), 503-505.
- Noji, T., Karasawa, A., & Kusaka, H. (2004). Adenosine uptake inhibitors. *European journal of pharmacology*, 495(1), 1-16.
- Paes-de-Carvalho, R. (2002). Adenosine as a signaling molecule in the retina: biochemical and developmental aspects. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 74, 437-451.

- Parker, M. D., HYDE, R. J., YAO, S. Y., MCROBERT, L., CASS, C. E., YOUNG, J. D., ... & BALDWIN, S. A. (2000). Identification of a nucleoside/nucleobase transporter from *Plasmodium falciparum*, a novel target for anti-malarial chemotherapy. *Biochemical Journal*, 349(1), 67-75.
- E Parkinson, F., L Damaraju, V., Graham, K., YM Yao, S., A Baldwin, S., E Cass, C., & D Young, J. (2011). Molecular biology of nucleoside transporters and their distributions and functions in the brain. *Current topics in medicinal chemistry*, 11(8), 948-972.
- Pereira-Neves, A., & Benchimol, M. (2007). Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biology of the Cell*, 99(2), 87-101.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., & Garber, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology reviews*, 11(2), 300-317.
- Poole, D. N., & McClelland, R. S. (2013). Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually transmitted infections*, 89(6), 418-422.
- Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS (Brazil). (2008). *Prevalências e freqüências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids..
- Quinlivan, E. B., Patel, S. N., Grodensky, C. A., Golin, C. E., Tien, H. C., & Hobbs, M. M. (2012). Modeling the impact of *Trichomonas vaginalis* infection on HIV transmission in HIV-infected individuals in medical care. *Sexually transmitted diseases*, 39(9), 671.
- Ralevic, V., & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews*, 50(3), 413-492.

- Robinson, S. C. (1962). Trichomonal vaginitis resistant to metranidazole. *Canadian Medical Association Journal*, 86(14), 665.
- Rowley, J., Vander Hoorn, S., Korenromp, E., Low, N., Unemo, M., Abu-Raddad, L. J., ... & Taylor, M. M. (2019). Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bulletin of the World Health Organization*, 97(8), 548.
- Saenz, R. E., Paz, H. M., Johnson, C. M., Marr, J. J., Nelson, D. J., Pattishall, K. H., & Rogers, M. D. (1989). Treatment of American cutaneous leishmaniasis with orally administered allopurinol riboside. *Journal of Infectious Diseases*, 160(1), 153-158.
- Sanchez, M. A., Ullman, B., Landfear, S. M., & Carter, N. S. (1999). Cloning and functional expression of a gene encoding a P1 type nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(42), 30244-30249.
- Sansom, F. M., Robson, S. C., & Hartland, E. L. (2008). Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 765-781.
- Schmidt, A. P., Lara, D. R., & Souza, D. O. (2007). Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacology & therapeutics*, 116(3), 401-416.
- Schwebke, J. R., & Barrientes, F. J. (2006). Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(12), 4209-4210.
- Schwebke, J. R., & Burgess, D. (2004). Trichomoniasis. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 794-803.

- Secor, W. E., Meites, E., Starr, M. C., & Workowski, K. A. (2014). Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 90(5), 800.
- Sena, A. C., Miller, W. C., Hobbs, M. M., Schwebke, J. R., Leone, P. A., Swygard, H., ... & Cohen, M. S. (2007). *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical infectious diseases*, 13-22.
- Singh, B. N., Lucas, J. J., & Fichorova, R. N. (2007). *Trichomonas vaginalis*: pathobiology and pathogenesis. *Emerging Protozoan Pathogens. London, UK: Taylor & Francis Group*, 411-455.
- Sutcliffe, S. (2010). Sexually transmitted infections and risk of prostate cancer: review of historical and emerging hypotheses. *Future oncology*, 6(8), 1289-1311.
- Tasca, T., Bonan, C. D., De Carli, G. A., Battastini, A. M., & Sarkis, J. J. (2003). Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1. 3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Experimental parasitology*, 105(2), 167-173.
- Tasca, T., Bonan, C. D., De Carli, G. A., Sarkis, J. J. F., & Alderete, J. F. (2005). Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*, 131(1), 71-78.
- Tasca, T., Bonan, C. D., De Carli, G. A., & Sarkis, J. J. (2004). *Trichomonas vaginalis*: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability. *Parasitology research*, 93(4), 300-303.
- Torres-Romero, J. C., & Arroyo, R. (2009). Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1065-1074.

- Urbina, J. A. (2001). Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Current opinion in infectious diseases*, 14(6), 733-741.
- Vasudevan, G., Carter, N. S., Drew, M. E., Beverley, S. M., Sanchez, M. A., Seyfang, A., ... & Landfear, S. M. (1998). Cloning of Leishmania nucleoside transporter genes by rescue of a transport-deficient mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 9873-9878.
- Virgilio, F. D., Baricordi, O. R., Romagnoli, R., & Baraldi, P. G. (2005). Leukocyte P2 receptors: a novel target for anti-inflammatory and antitumor therapy. *Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders*, 5(1), 85-99.
- Weizenmann, M., Frasson, A. P., de Barros, M. P., Vieira, P. D. B., Rosemberg, D. B., De Carli, G. A., ... & Tasca, T. (2011). Kinetic characterization and gene expression of adenosine deaminase in intact trophozoites of *Trichomonas vaginalis*. *FEMS microbiology letters*, 319(2), 115-124.
- Workowski, K. A., Bachmann, L. H., Chan, P. A., Johnston, C. M., Muzny, C. A., Park, I., ... & Bolan, G. A. (2021). Sexually transmitted infections treatment guidelines, 2021. *MMWR Recommendations and Reports*, 70(4), 1.
- Workowski, K. A., & Bolan, G. A. (2015). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports*, 64(RR-03), 1.
- World Health Organization. (2012). Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008.
- Yarlett, N., Martinez, M. P., Goldberg, B., Kramer, D. L., & Porter, C. W. (2000). Dependence of *Trichomonas vaginalis* upon polyamine backconversion. *Microbiology*, 146(10), 2715-2722.

- Zimmermann, H. (1992). 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochemical Journal*, 285(Pt 2), 345.
- Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 362(4), 299-309.
- Zimmermann, H. (2001). Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research*, 52(1-2), 44-56.
- Zimmermann, H. (2020). History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling. *Biochemical Pharmacology*, 114322.
- Zimmermann, H. (2021). Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases and ecto-5'-nucleotidase in purinergic signaling: how the field developed and where we are now. *Purinergic Signalling*, 17(1), 117-125.

IX.1 Anexo 1: Autorização para uso de imagem como Figura 2 da seção Revisão do Tema.

[Home](#)
[Help](#)
[Email Support](#)
[Tiana Tasca](#)

Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*
 Author: Narsimha Rao Munagala, Ching C Wang
 Publication: Molecular and Biochemical Parasitology
 Publisher: Elsevier
 Date: 3 April 2003
 Copyright © 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Tiana Tasca ("you") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5146731067747

License date Sep 12, 2021

Licensed Content

Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Molecular and Biochemical Parasitology
Licensed Content Title	Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in <i>Trichomonas vaginalis</i>
Licensed Content Author	Narsimha Rao Munagala, Ching C Wang
Licensed Content Date	Apr 3, 2003
Licensed Content Volume	127
Licensed Content Issue	2
Licensed Content Pages	7

About Your Work

Title	Search for therapeutic target in purinergic signalling in <i>Trichomonas vaginalis</i> : adenosine transporter inhibition
Institution name	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Expected presentation date	Sep 2021

Requestor Location

Tiana Tasca
Avenida Ipiranga, 2752
Porto Alegre, other 90610000
Brazil
Attn: Tiana Tasca

Price

\$ Price	0.00 USD
Total	0.00 USD

[CLOSE WINDOW](#)

Order Details

Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No

Additional Data

Portions	Figure 5 on page 148
-----------------	----------------------

Tax Details


Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
-------------------------	----------------

Total: 0.00 USD


[ORDER MORE](#)

© 2021 Copyright - All Rights Reserved. | [Copyright Clearance Center, Inc.](#) | [Privacy statement](#) | [Terms and Conditions](#)
 Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customerservice@copyright.com

IX.1 Anexo 2: Autorização para uso de imagem como Figura 3 da seção Revisão do Tema.



[Home](#)
[Help](#)
[Live Chat](#)
[Tiana Tasca](#)



The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*
 Author: Elisa E. Figueroa-Angulo, Francisco J. Rendón-Gandarilla, Jonathan Puente-Rivera, Jaesoon S. Caila-Choque, Rosa E. Cárdenas-Guerra, Jaime Ortega-López, Laura I. Quintas-Granados, M. Elibeth Álvarez-Sánchez, Rossana Arroyo
 Publication: Microbes and Infection
 Publisher: Elsevier
 Date: December 2012
 Copyright © 2012 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS All rights reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Tiana Tasca ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number	514760119858
License date	Sep 14, 2021
Licensed Content	Elsevier
Licensed Content Publisher	Microbes and Infection
Licensed Content Publication	The effects of environmental factors on the virulence of <i>Trichomonas vaginalis</i>
Licensed Content Title	Elisa E. Figueroa-Angulo, Francisco J. Rendón-Gandarilla, Jonathan Puente-Rivera, Jaesoon S. Caila-Choque, Rosa E. Cárdenas-Guerra, Jaime Ortega-López, Laura I. Quintas-Granados, M. Elibeth Álvarez-Sánchez, Rossana Arroyo
Licensed Content Author	Dec 1, 2012
Licensed Content Date	14
Licensed Content Volume	15
Licensed Content Issue	17
Licensed Content Pages	
About Your Work	
Title	Search for therapeutic target in purinergic signaling in <i>Trichomonas vaginalis</i> : adenosine transporter inhibition
Institution name	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Expected presentation date	Sep 2021
Requestor Location	Tiana Tasca Avenida Ipiranga, 2752
Requestor Location	Porto Alegre, other 90610000 Brazil Attn: Tiana Tasca
\$ Price	
Total	0.00 USD

Order Details

Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	4
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Additional Data	
Portions	Figure 4
Tax Details	
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12

Total: 0.00 USD

ORDER MORE

CLOSE WINDOW

© 2021 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions

Comments? We would like to hear from you. Email us at customer@copyright.com