

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

Atividade anti-Trichomonas vaginalis de 1,10-fenantrolina-5,6-diona e seus derivados metálicos: efeitos no metabolismo oxidativo e indução de morte por apoptose-like

GRAZIELA DE VARGAS RIGO

PORTO ALEGRE, 2018

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

Atividade anti-Trichomonas vaginalis de 1,10-fenantrolina-5,6-diona e seus derivados metálicos: efeitos no metabolismo oxidativo e indução de morte por apoptose-like

Dissertação apresentada por
Graziela de Vargas Rigo para
obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr. Tiana Tasca

Coorientador: Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos

PORTO ALEGRE, 2018

Tese 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 30.08.2018, pela Banca examinadora constituída por:

Profa. Dr. Aline Rigon Zimmer

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Danielle da Silva Trentin

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Rigo, Graziela de Vargas

Atividade anti-Trichomonas vaginalis de 1,10-fenantrolina-5,6-diona e seus derivados metálicos: efeitos no metabolismo oxidativo e indução de morte por apoptose-like / Graziela de Vargas Rigo. -- 2018. 124 f.

Orientadora: Tiana Tasca.

Coorientador: André Luis Souza dos Santos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Trichomonas vaginalis. 2. 1,10-fenantrolina-5,6-diona. 3. sinergismo. 4. metabolismo oxidativo. 5. detoxificação. I. Tasca, Tiana, orient. II. Santos, André Luis Souza dos, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da UFRGS em colaboração com Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes, Departamento de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, com financiamento do CNPq e FAPERGS. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Agradecimentos

A concretização desta dissertação contou com apoios e incentivos essenciais, sem os quais não se teria tornado realidade e aos quais serei eternamente grata.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente à Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas por me oportunizar um 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 aceitado o convite.

À Prof^a Dr. Tiana Tasca agradeço pela orientação, ensinamentos (pessoais e acadêmicos), incentivos, puxões de orelha, paciência e, sobretudo, pela amizade incondicional durante os últimos sete anos. Você é uma pessoa ímpar, um exemplo de profissional e ética que transmite todo amor pelo que faz e contagia a todos com sua alegria. Em ti busco inspiração em tudo o que faço e me orgulho de ser sua aluna.

Aos queridos amigos do GPTrico que tive a honra de conviver e aprender. Agradeço a todos que contribuíram para meu conhecimento em especial à Muriel, Débora, Odelta e Camila que com muito carinho, me incluíram como partes de suas teses e dissertações como bolsista de iniciação científica e forneceram ensinamentos essenciais para realização deste mestrado. Aos atuais colegas de pesquisa: Márcia, Juliana, Carla, Brenda, Giulia, Micheli e Acácia pela maravilhosa convivência e por dividirem comigo comemorações e frustrações da rotina. Agradeço em especial à Brenda pela disposição e interesse em me auxiliar nos experimentos, bem como pela amizade construída ao longo dos anos.

Ao Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos, pela coorientação e competência científica para realização deste projeto, bem como pela disponibilidade e amizade demonstradas.

Ao Prof. Dr. Alexandre Macedo e seu grupo de pesquisa, especialmente à Flavia, Luciana, Rodrigo, Júlia, Viviane e a todos que estiveram presentes agradeço

pela convivência agradável, incentivo e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

A todos meus amigos que, de uma forma ou outra, estiveram presentes e me apoiaram durante este período. Às amigadas que a Farmácia me deu e estiveram presentes desde o início da graduação, agradeço por todo carinho, palavras de conforto, momentos de descontração, companheirismo e apoio. Especialmente à Júlia que, além de uma amiga muito especial, auxiliou na realização de experimentos deste projeto.

À Flavia Barbosa pela amizade construída desde o colégio. Agradeço por dividir as alegrias e incertezas, pelo carinho, conselhos e paciência durante todo meu mestrado.

Ao Jonas, meu namorado, por permanecer ao meu lado nesta etapa e por todo incentivo, amor, carinho e paciência nos momentos de ausência.

Agradeço especialmente a minha família que sempre me incentivou a concretizar o sonho do mestrado. À Francine, minha irmã pela excelente amizade, acolhimento e apoio neste período. Aos meus amados pais, João e Fátima, que sempre valorizaram a educação acima de tudo e sempre se esforçaram para que realizássemos nossos sonhos. Muito obrigada por compreender minhas ausências, pelo apoio incansável em todos os momentos, incentivos para nunca desistir e amor incondicional.

RESUMO

Tricomoníase é a infecção sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo e está associada a complicações, como parto prematuro, baixo peso ao nascer, infertilidade e predisposição ao câncer do colo do útero e próstata. Além disso, facilita a aquisição e transmissão do HIV. O manejo da infecção por *T. vaginalis* ocorre através de fármacos da classe dos 5-nitroimidazólicos, metronidazol e tinidazol; no entanto, falhas no tratamento estão associadas ao aumento da resistência ao metronidazol (2,5 a 10%). Alguns derivados do fenantreno têm sido investigados devido a potencial atividade contra vírus, bactérias, fungos e ação antitumoral. Efeitos antimicrobianos são descritos para o composto 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona), ligado ou não a metais como cobre (Cu^{2+}) e prata (Ag^+). Neste contexto, este estudo revelou uma potente atividade tricomonocida de fendiona e derivados metálicos, $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$ e $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, contra isolados da American Type Culture Collection (ATCC) e isolados clínicos frescos de *T. vaginalis*, com valor de $\text{IC}_{50} < 1,0 \mu\text{M}$ para o composto mais ativo, Cu-fendiona. Além de ter apresentado atividade mais potente que o metronidazol, Cu-fendiona demonstrou ação sinérgica com este fármaco. Ensaios *in vitro* com fibroblastos, linhagem celular não tumoral mamífera, demonstraram baixa citotoxicidade, e o composto Cu-fendiona apresentou maior índice de seletividade ($\text{IS} \geq 11$), revelando atividade seletiva ao parasito. Os compostos agem aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio reduzindo a expressão gênica de enzimas antioxidantes responsáveis pela detoxificação, com consequente acúmulo de espécies nocivas que levam a danos e morte do parasito. Além disso, quando investigado o tipo de morte envolvido no mecanismo de ação, foi possível observar morte celular programada semelhante à apoptose. Considerando a crescente resistência observada no tratamento de *T. vaginalis* e o impacto dessa infecção na saúde pública, a necessidade de novas terapias para o tratamento da tricomoníase humana é notável. Estes resultados destacam a importância do composto fendiona e seus derivados metálicos como moléculas de interesse farmacêutico.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*, 1,10-fenantrolina-5,6-diona, derivados metálicos, sinergismo, apoptose, metabolismo oxidativo, detoxificação.

ABSTRACT

Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its metal derivatives: effects on oxidative metabolism and apoptosis-like death induction

Trichomoniasis is the most common non-viral sexually transmitted infection worldwide and is associated with some complications such as premature birth, low birth weight, infertility, and predisposition to cervical and prostate cancers. In addition, it can facilitate the acquisition and transmission of HIV. Management of *T. vaginalis* infection occurs through the 5-nitroimidazole drugs, metronidazole and tinidazole; however, treatment failures are associated with increase in metronidazole resistance (2.5 to 10%). Some phenanthrene derivatives have been investigated due to potential activity against viruses, bacteria, fungi, and antitumor action. These effects can also be produced by 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione), bound or not to metals such as copper (Cu^{2+}) and silver (Ag^+), as potential antimicrobial compounds. Hence, this study revealed a potent trichomonocidal activity of phendione and two metal derivatives, $[\text{Ag}(\text{phendione})_2]\text{ClO}_4$ and $[\text{Cu}(\text{phendione})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, against American Type Culture Collection (ATCC) and fresh clinical *T. vaginalis* isolates, with IC_{50} value $<1.0 \mu\text{M}$ for the most active compound, Cu-phendione. Besides demonstrated higher activity than metronidazole, Cu-phendione showed synergic association with this clinical drug. In addition, *in vitro* assays with fibroblasts, non-tumor mammalian cell lineage, showed low cytotoxicity, and Cu-phendione had a highest selectivity index ($\text{SI} \geq 11$), revealing selective activity to the parasite. Furthermore, when the type of cell death involved in the mechanism of action was investigated, programmed cell death resemble apoptosis could be observed. Compounds acted by increasing reactive oxygen species, reduction in gene expression of detoxification enzymes, with consequently accumulation of harmful species that lead to damage and death of the parasite. Considering the growing resistance observed in *T. vaginalis* treatment and the impact of this infection on public health, the need for new therapies for the treatment of human trichomoniasis is remarkable. These results highlight the importance of these phendione and metal derivatives as molecules of pharmaceutical interest.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, 1,10-phenanthroline-5,6-dione, metallodrugs, synergism, apoptosis, oxidative metabolism, detoxification.

LISTA DE FIGURAS

I. Estado da arte	
Figura 1 Características morfológicas de <i>T. vaginalis</i>	26
Figura 2: Vias redox no parasito microaerofílico <i>T. vaginalis</i>	37
Figura 3: Estrutura básica do fenantreno.....	41
Figura 4: Estruturas da molécula de fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona.....	43
II. Capítulo I	
Figura 1. Growth kinetic curves of ATCC 30236 <i>T. vaginalis</i> isolate.....	55
III. Capítulo II	
Figura 1. Annexin V FITC and granularity by flow cytometry analysis of <i>T. vaginalis</i> treated or not with compounds.	72
Figura 2. SEM of <i>T. vaginalis</i> treated or not with Cu-phendione.....	74
Figura 3. <i>T. vaginalis</i> DNA fragmentation by electrophoresis.....	75
Figura 4. Reactive oxygen species production in <i>T. vaginalis</i> during treatment with metronidazole, phendione, Ag-phendione, and Cu-phendione.....	76
Figura 5. Antioxidant enzymes gene expression in <i>T. vaginalis</i> treated with metronidazole, phendione, Ag-phendione, and Cu-phendione.....	77
Figura 6: Representation of <i>T. vaginalis</i> oxidative metabolism enzymes effects after metronidazole and compounds treatments.....	81

LISTA DE TABELAS

I. Capítulo I

Tabela 1. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity and cytotoxicity effect of metronidazole, phendione and its metal complexes.....54

Tabela 2. FICI data for *T. vaginalis* TV-LACM15 isolate for each combination tested.....56

II. Capítulo II

Tabela 1. Parameters used in qRT-PCR.69

Table 2: Granularity analysis of phendione and derivatives treated *T. vaginalis*.....73

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: *Acquire Immune Deficiency Syndrome*

ATCC – *American Type Culture Collection*

CC₅₀: Concentração inibitória que reduz 50% da densidade célula

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

CPs – Cisteína proteinases

CEVs: células epiteliais vaginais

EROs: espécies reativas de oxigênio

FDA: *Food and Drug Administration*

FDP: proteínas *flavodiiron*;

HIV: *Human Immunodeficiency Virus*

HMVII: Linhagem tumoral de células epiteliais vaginalis

IC₅₀: Concentração inibitória que reduz 50% da densidade trofozoítos

IS: índice de seletividade

Isf: flavoproteína contendo ferro-enxofre

IST: infecção sexualmente transmissível

MIC: Concentração inibitória mínima

MTZ: Metronidazol

OMS: Organização mundial da saúde

OsmC: proteínas osmoticamente induzíveis.

PCD: Morte celular programada, do inglês *programmed cell death*

PFOR: Piruvato-ferredoxina oxidoreductase

PRX: peroxiredoxina

SOD: superóxido desmutase

TRX: Tioredoxina reductase

TV-LACH – Isolado de *T. vaginalis* proveniente de amostra de urina de paciente do sexo masculino

TV-LACM - Isolado de *T. vaginalis* proveniente de amostra de urina de paciente do sexo feminino

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	19
II.	ESTADO DA ARTE	23
II.1	<i>Trichomonas vaginalis</i>	25
II.2	Tricomoníase.....	28
II.3	Mecanismos de patogenicidade e resposta imune na tricomoníase	31
II.3.2	Espécies reativas de oxigênio e metabolismo oxidativo	36
II.4	Tratamento	39
II.5	Fenantreno	41
II.5.1	1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona)	42
III.	OBJETIVOS	45
IV.	CAPÍTULO I.....	49
V.	CAPÍTULO II.....	59
VI.	DISCUSSÃO	87
VII.	CONCLUSÕES	97
VIII.	PERSPECTIVAS	101
IX.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
X.	ANEXOS	119
X.1	Anexo 1: Autorização para uso de imagem como figura 2 da seção Estado da Arte.....	121

I. Introdução

A tricomoníase é a IST de origem não viral mais comum no mundo. A estimativa global da infecção em 2008 foi uma incidência de aproximadamente 276 milhões de novos casos e uma prevalência de 187 milhões de adultos infectados (WHO, 2012). A prevalência mundial da tricomoníase é muito maior quando comparada a outras ISTs curáveis, como gonorreia, sífilis e clamídia. Em contrapartida, a tricomoníase não é notificável e não existe sistema de vigilância e detecção de isolados resistentes ao tratamento, recebendo relativamente pouca ênfase dos programas de saúde pública de controle de ISTs (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006; WHO, 2012).

As manifestações clínicas da tricomoníase variam desde a apresentação assintomática até um estado de severa inflamação (vaginite) (LEHKER e ALDERETE, 2000). Nos casos sintomáticos, com quadro de infecção aguda, a inflamação é caracterizada por corrimento purulento, irritação e prurido vulvar, dor abdominal baixa e disúria, além de pontos hemorrágicos na mucosa vaginal ou cervical acompanhados de edema e eritema, que conferem uma aparência conhecida como *colpitis macularis* ou cérvix com aspecto de morango (MILLER e NYIRJESY, 2011). Os homens geralmente são assintomáticos e considerados carreadores de *T. vaginalis* (PETRIN, 1998; SEÑA *et al.*, 2007). Quando sintomática, a doença está associada à uretrite, epididimite, prostatite, função espermática reduzida e infertilidade (FICHOROVA, 2009). Atualmente 80% dos casos são assintomáticos, o que torna a doença silenciosa e de curso crônico (POOLE & MCCLELLAND, 2013), levando a complicações como doença inflamatória pélvica, câncer cervical e de próstata (VIIKKI *et al.*, 2000; SUTCLIFFE, 2010), parto prematuro e baixo peso de bebês nascidos de mães infectadas (COTCH *et al.*, 1997). Muito importante e já bastante estabelecida é a associação da tricomoníase com o aumento da transmissão do HIV (SORVILLO *et al.*, 2001; MASON *et al.*, 2005; MCCLELLAND *et al.*, 2007; KISSINGER E ADAMSKI, 2013).

No tratamento da tricomoníase, os únicos fármacos recomendados pelo FDA/EUA são o MTZ e tinidazol (TNZ). Ambos pertencem à classe dos 5-nitroimidazóis, com idêntico mecanismo de ação, e apresentam uma série de efeitos colaterais que incluem náuseas, vômitos, cefaleia, insônia, vertigem e sonolência e reação de hipersensibilidade (PEARLMAN *et al.*, 1996; MILLER e NYIRJESY, 2011). No entanto, o uso de MTZ na gestação é recomendado pelo CDC/EUA, visto que mutagenicidade e teratogenicidade não foram comprovadas em estudos recentes

(VIEIRA *et al.*, 2017). Ainda, outro agravante da tricomoníase são os casos emergentes de resistência dos isolados frente a esses fármacos, considerados uma falha terapêutica no tratamento (DUNNE *et al.*, 2003). É estimado que aproximadamente 2,5 a 9,6% dos casos de tricomoníase apresentem algum nível de resistência no tratamento com MTZ (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). Considerando-se a alta prevalência mundial da tricomoníase, aproximadamente 187 milhões de casos, esta resistência torna-se um fator preocupante na saúde pública.

Neste contexto, a busca de novos alvos e moléculas com potencial terapêutico para o controle da tricomoníase é de extrema relevância perante o cenário mundial desta infecção com consequências no controle da AIDS (VIEIRA *et al.*, 2017). Derivados de fenantreno têm sido investigados com potencial ação antimicrobiana. Essa molécula é encontrada na natureza e compõe alguns dos opiáceos naturais e sintéticos utilizados, como o caso da morfina, codeína e naloxona (McCANN *et al.*, 2012). Entre seus derivados, a molécula 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona) ligada ou não a metais como cobre (Cu^{2+}) e prata (Ag^+), respectivamente, $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$, são alvos de investigação antimicrobiana (SUBHAN *et al.*, 2014; TAY *et al.*, 2015; VIGANOR *et al.*, 2016; GRANATO *et al.*, 2017). A associação de fendiona com metais como cobre e prata conferiu uma atividade antimicrobiana mais potente (ESHWIKA *et al.*, 2004; MCCANN *et al.*, 2012). Estudos de toxicidade *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella* e em camundongos já foram realizados e os compostos mostraram ser bem tolerados, em comparação com a cisplatina utilizada na clínica (McCANN *et al.*, 2012). Considerando-se a falta de opções terapêuticas para a tricomoníase, além dos dois fármacos da classe do 5-nitroimidazóis, os compostos derivados da fendiona despertam interesse para a obtenção de novos candidatos a fármacos tricomonocidas.

II. Estado da arte

II.1 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis é um protozoário flagelado que pertence à família Trichomonadidae, à ordem Trichomonadida, à classe Parabasalia e ao filo Zoomastigina. O primeiro relato da espécie *T. vaginalis* foi realizado em amostra de secreção vaginal humana, descrito pelo médico europeu Alfred Donné, em 1836 (SCHWEBKE e BURGESS, 2004). O homem é o único hospedeiro natural e coloniza o trato reprodutivo feminino e a uretra masculina. Por quase 80 anos, a presença deste protozoário foi considerada inofensiva, pertencendo à microbiota vaginal, até ser relacionado com vaginite (FICHOROVA, 2009).

O polimorfismo atribuído ao *T. vaginalis* decorre da sua capacidade de alterar a morfologia, adequando à sua necessidade de sobrevivência. Assim como os demais tricomonadídeos, exibe apenas estágio trofozoítico como forma infectante, podendo apresentar-se no formato piriforme, elipsoide ou oval em meio de cultivo ou secreções (PETRIN *et al.*, 1998). Quando aderido às CEVs adquire a forma ameboide, apresentando pseudópodes para fixação e aquisição de nutrientes por meio da fagocitose de bactérias, fragmentos necróticos de CEVs, espermatozoides e eritrócitos (HONIGBERG e BRUGEROLLE, 1990). As condições físico-químicas como pH, temperatura, tensão de oxigênio e força iônica exercem grande influência na sua morfologia. Formações de estruturas arredondadas, imóveis e com flagelos internalizados, denominadas de pseudocistos são descritas quando os trofozoítos são submetidos a ambientes desfavoráveis; no entanto, por apresentar um corpo celular muito plástico, possuem a capacidade de retornar ao formato piriforme quando as condições ideais forem reestabelecidas (BENCHIMOL, 2004).

A espécie *T. vaginalis* apresenta um ciclo de vida simplificado com multiplicação através de divisão binária longitudinal assexuada e transmissão através de relação sexual. O organismo apresenta uma estrutura composta por quatro flagelos anteriores livres e desiguais e um quinto flagelo incorporado à membrana ondulante, responsáveis pela motilidade característica do protozoário. O axóstilo apresenta-se como uma estrutura rígida que se projeta do interior do parasito, compõe a extremidade posterior, participando do processo de cariocinese. No interior do organismo destacam-se a presença do aparelho parabasal e filamentos parabasais, onde se localiza o aparelho de Golgi, composto por diversas

vesículas bem desenvolvidas relacionadas com processamento de proteínas. O núcleo apresenta-se no formato elipsoide, localiza-se próximo à extremidade anterior e possui dupla membrana celular envolta por retículo endoplasmático. Diferentemente dos eucariotos, os tricomonadídeos não apresentam mitocôndria nem peroxissomos, mas possuem grânulos densos paraxostilares denominados hidrogenossomos. Essas organelas contêm enzimas chaves que participam do metabolismo do piruvato no processo de glicólise, formação de hidrogênio molecular e síntese de ATP (BENCHIMOL, 2004).

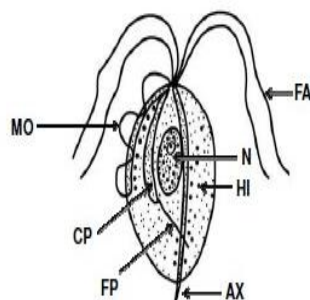


Figura 1: Características morfológicas de *T. vaginalis*. MO: membrana ondulante, CP: corpo parabasal, FP: filamento parabasal, AX: axóstilo, HI: hidrogenossomo, N: núcleo, FA: flagelos anteriores livres. Adaptado: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Trichomoniasis.htm>.

O sucesso da infecção depende de diversos fatores necessários para o seu estabelecimento e sobrevivência. Entre eles, destaca-se o fornecimento de nutrientes essenciais para seu metabolismo, como carboidratos, aminoácidos, lipídeos, nucleotídeos púricos e pirimidínicos, ferro, vitaminas e sais inorgânicos adquiridos *in vivo* através da secreção vaginal ou fagocitose de bactérias e células do hospedeiro ou *in vitro* pela suplementação do meio de cultura. *T. vaginalis* é capaz de metabolizar carboidratos tanto no citoplasma quanto nos hidrogenossomos através de vias fermentativas e apresenta uma grande capacidade de adaptar seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de carbono, a fim de manter a homeostase interna. Entre os produtos deste metabolismo estão incluídos acetato, lactato, malato, glicerol, CO₂ e, sob condições anaeróbicas, H₂. Os carboidratos são a principal fonte de energia e, na ausência deste nutriente, a sobrevivência do parasito é mantida pelo fornecimento de aminoácidos; especialmente arginina, treonina e leucina. Fazem parte da

composição de suas estruturas o colesterol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e esfingomiéline; no entanto, o metabolismo lipídico carece de vias metabólicas necessárias para a síntese de esteróis e ácidos graxos e depende do fornecimento por fontes exógenas. Além disso, adenina e guanina ou seus nucleosídeos são necessários para o crescimento, além de timidina, citidina, uracila e/ou uridina, porém *T. vaginalis* não realiza síntese *de novo* de nucleotídeos púricos e pirimídicos e rotas de salvação para aquisição dessas moléculas são utilizadas. Entre os sais orgânicos essenciais para a sobrevivência deste parasito, destaca-se a influência do ferro. *T. vaginalis* possui múltiplos sistemas de captação de ferro, utilizando-o no crescimento, regulação de fatores de virulência e adaptação às diferentes mudanças no sítio de infecção (HEYWORTH *et al.*, 1982, 1984; PETRIN, 1998; TORRES-ROMERO e ARROYO, 2009).

O metabolismo energético de *T. vaginalis* é um processo complexo que envolve diferentes vias. Estudos sugerem que os hidrogenossomos possuem um ancestral comum com as mitocôndrias devido a semelhança na importação de proteínas e produção de H₂, no entanto carecem de citocromos, cadeia respiratória e DNA (DYALL E JOHNSON, 2000). Diferentemente das células que possuem predominante fornecimento de energia através de mitocôndrias, neste parasito apenas 30% do ATP necessário para sobrevivência é fornecido via hidrogenossomos, sendo que o restante é obtido via metabolismo anaeróbico citoplasmático (CHOSE *et al.*, 2003a). Essa diferença fisiológica possui grande importância ao analisar o processo de morte celular, uma vez que a mitocôndria tem um papel central durante a morte celular.

A morte celular em organismos que possuem mitocôndria pode ocorrer através de dois principais mecanismos, necrose ou PCD. No primeiro é observada a forma passiva e descontrolada de morte celular, enquanto no segundo ocorre um processo altamente regulado e com vias bem definidas. PCD é classificado com base nas características observadas: apoptótica (tipo I), autofágica (tipo II) e não-lisossomal (tipo III). O tipo I, denominado de apoptose, apresenta alterações morfológicas características como encolhimento celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Neste processo, diferentes proteínas pró-apoptóticas resultantes da ativação de vias de morte movem-se do citoplasma para interagir com receptores da mitocôndria, esta interação leva à perda da integridade da membrana mitocondrial e à liberação de fatores apoptogênicos. Na autofagia, tipo II,

o conteúdo citoplasmático da célula é sequestrado dentro de vacúolos de membrana dupla e conduzido ao lisossomo para degradação. Por fim, tipo III ou não-lisossomal é semelhante à necrose com “inchaço” de organelas e formação de espaços citoplasmáticos vazios (DEBNATH *et al.*, 2005). O processo de morte celular leva em conta características morfológicas, funcionais e bioquímicas para definição e interpretação. Segundo o mais recente guia publicado pelo Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular, já foram descritas diferentes formas de morte celular, como: apoptose intrínseca, apoptose extrínseca, necrose de transição de permeabilidade mitocondrial, necroptose, ferroptose, piroptose, partanatos, morte celular entótica, morte celular NETótica, morte celular dependente de lisossomos, morte celular dependente de autofagia, morte celular imunogênica, senescência celular e catástrofe mitótica (GALLUZZI *et al.*, 2018).

Tricomonadídeos são organismos que carecem de mitocôndria, no entanto, casos de morte não necrótica já foram descritos. Chose e colaboradores (2003a) relacionam processos de PCD em protozoários amitocondriados, como *T. vaginalis* e *Giardia duodenalis*, com algumas características que se assemelham à apoptose. Avaliação com microscopia de epifluorescência revelou várias formas de condensação de cromatina previamente descritas durante a PCD de organismos unicelulares e multicelulares mitocondriados. Essas formas são comuns à apoptose e à paraptose, uma forma alternativa de PCD. Neste processo ressalta-se a importância de uma classe de cisteína peptidases, denominadas de caspases, essenciais no processo de apoptose, pois clivam proteínas alvos para iniciar o processo de morte celular através de vias altamente reguladas (PFEFFER e SINGH, 2018). Até o momento, este grupo de peptidases não foi descrito em *T. vaginalis*, entretanto é sugerida a presença de uma via denominada *caspase-like* (CHOSE *et al.*, 2003b, OFER *et al.*, 2008).

II.2 Tricomoníase

T. vaginalis é o agente etiológico da tricomoníase, IST não viral mais comum no mundo. Dados que sustentam essa classificação se baseiam: (1) na alta frequência de infecções na uretra e/ou próstata, (2) na alta prevalência desta infecção entre mulheres assistidas em clínicas de IST e (3) no fato de o protozoário não sobreviver fora do sítio de infecção, ao menos que seja protegido da

dessecação (MENEZES *et al.*, 2016). Apesar da ampla aceitação relacionada ao meio de transmissão, alguns autores relataram a possibilidade de aquisição por meio não sexual, através do compartilhamento da água e sabonete de banho e por meios iatrogênicos (PETERSON e DRAME, 2010; CRUCITTI *et al.*, 2011). A aquisição vertical durante o parto vaginal já foi descrita, ocorrendo com uma incidência de 2 a 17%. O recém-nascido coloniza-se ao ter contato com os trofozoítos aderidos às células epiteliais escamosas da vagina da mãe, causando doença respiratória com produção de muco. O tratamento com MTZ é recomendado para recém-nascidos que apresentem os sintomas, independente da idade (BRUINS *et al.*, 2013, VIEIRA *et al.*, 2017).

A estimativa global da infecção em 2008 foi uma incidência de aproximadamente 276 milhões de novos casos e uma prevalência de 187 milhões de adultos infectados, entre 15 e 49 anos (WHO, 2012). Na cidade de Porto Alegre, RS, um estudo realizado no ano de 1987, mostrou uma taxa de prevalência da tricomoníase de 37,5% entre as mulheres gaúchas (Ministério da Saúde, 2010). Outro estudo mais recente, com população de um bairro da mesma cidade, revelou uma prevalência de 20% (MICHEL *et al.*, 2006). Entretanto, esses dados são subestimados, pois existem poucos estudos de prevalência com boa qualidade, as informações com relação à estimativa de duração da infecção são limitadas, os métodos de diagnóstico laboratorial apresentam baixa sensibilidade e, além disso, há evidências de casos assintomáticos não diagnosticados em ambos os sexos (FICHOROVA, 2009; WHO, 2012). A prevalência mundial da tricomoníase é muito maior quando comparada a outras ISTs curáveis, como gonorreia e sífilis, ambas com 36,4 milhões, e clamídia, com 100,4 milhões de adultos infectados, entre 15 e 49 anos. Em contrapartida, a tricomoníase não é notificável e não existe sistema de vigilância e detecção de isolados resistentes ao tratamento, recebendo relativamente pouca ênfase dos programas de saúde pública de controle de ISTs (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006; WHO, 2012).

As manifestações clínicas da tricomoníase variam desde a apresentação assintomática até um estado de severa inflamação (vaginite) (LEHKER e ALDERETE, 2000). Nos casos sintomáticos, com quadro de infecção aguda, a inflamação é caracterizada por corrimento purulento, irritação e prurido vulvar, dor abdominal baixa e disúria, além de pontos hemorrágicos na mucosa vaginal ou cervical acompanhados de edema e eritema, que conferem uma aparência

conhecida como *colpitis macularis* ou cervice com aspecto de morango (MILLER e NYIRJESY, 2011). Os homens geralmente são assintomáticos e considerados carreadores de *T. vaginalis*. A concentração de zinco (4,5 - 7,0 mM) encontrada nas secreções prostáticas apresenta efeito tóxico ao parasito, impedindo sua adesão às células e eliminando a tricomoníase (PETRIN, 1998; SEÑA *et al.*, 2007). No entanto, o parasito pode ser encontrado na glândula prostática causando inflamação aguda não específica (MITTEREGGER *et al.*, 2012). Quando sintomática, a doença está associada à uretrite, epididimite, prostatite, função espermática reduzida e infertilidade (FICHOROVA, 2009).

Atualmente 80% dos casos de tricomoníase são assintomáticos, o que torna a doença silenciosa e de curso crônico (POOLE & MCCLELLAND, 2013), levando a complicações como doença inflamatória pélvica, câncer cervical e de próstata (VIKKI *et al.*, 2000; SUTCLIFFE, 2010), parto prematuro e baixo peso de bebês nascidos de mães infectadas (COTCH *et al.*, 1997). Muito importante, e já bastante estabelecida, é a associação da tricomoníase com o aumento da transmissão do HIV (SORVILLO *et al.*, 2001; MASON *et al.*, 2005; MCCLELLAND *et al.*, 2007; KISSINGER e ADAMSKI, 2013). Mais recentemente, foi demonstrada a relação bidirecional, ou seja, o risco aumentado de aquisição do HIV associado à infecção por *T. vaginalis* e o risco de aquisição de *T. vaginalis* associado à infecção por HIV, sustentando a epidemia do HIV em populações onde a tricomoníase é endêmica (MAVEDZENGE *et al.*, 2010). Assim, o controle da infecção por *T. vaginalis* pode ser um dos meios mais eficazes para o manejo do risco de transmissão do HIV mundialmente.

Os mecanismos mediados pelo *T. vaginalis* que potencializam o risco de aquisição do HIV envolvem: (i) dano na monocamada do epitélio hospedeiro; (ii) recrutamento de linfócitos TCD4⁺ e macrófagos à mucosa vaginal e cervical; e (iii) secreção de cisteína peptidases que degradam o inibidor de protease leucocitária secretória, fator de proteção das mucosas contra patógenos e que desempenha um papel importante na prevenção da transmissão do HIV (GILBERT *et al.*, 2000; ALVAREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2007). Além disso, uma elevada carga viral é encontrada nos compartimentos seminal e cervicovaginal de pacientes com tricomoníase (MOODLEY *et al.*, 2002). Estes fatos corroboram entre si facilitando a aquisição e transmissão do HIV, já que, no sítio de infecção há acúmulo dos

linfócitos CD4⁺ (células-alvo do HIV), uma alta carga viral para infectá-los e pontos hemorrágicos que facilitam o acesso do vírus à corrente sanguínea.

A tricomoníase também está associada a tipos agressivos de câncer cervical e prostático. O câncer de colo de útero, também denominado de câncer cervical, é o terceiro mais frequente em mulheres, com uma estimativa de 16.370 novos casos, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil (INCA, 2018). Estudos correlacionam o desenvolvimento desta neoplasia à presença de *T. vaginalis*, uma vez que a reação inflamatória resultante da infecção causa anomalias celulares (ZHANG e BEGG, 1994). Vikki e colaboradores (2000) relatam que a associação de risco pode ser seis vezes maior na presença da tricomoníase. Câncer de próstata apresenta-se como o segundo mais comum entre os homens, com estimativa de 68.220 novos casos, segundo o Instituto Nacional do Câncer (2018). Primeiramente descrita em 1971, a relação da tricomoníase com a neoplasia vem sendo investigada, não apenas pela reação inflamatória, como também por danificar diretamente as células epiteliais da próstata (SUTCLIFFE, 2010).

II.3 Mecanismos de patogenicidade e resposta imune na tricomoníase

O parasito *T. vaginalis* estabelece-se no sítio de infecção através da interação com células epiteliais e componentes solúveis presentes na secreção vaginal e uretral. Este processo é chave na patogenia e baseia-se em uma complexa relação parasito-hospedeiro em que diversas moléculas são secretadas a fim de vencer as barreiras primárias do hospedeiro e estabelecer a infecção (LEHKER e ALDERETE, 2000).

O sítio urogenital apresenta diversos fatores protetores para impedir a colonização por microrganismos patogênicos. *T. vaginalis* necessita de uma intensa capacidade de adaptação para sobreviver à hostilidade do ambiente, como pH ácido, temperatura, presença de microbiota vaginal composta por lactobacilos, alteração hormonal cíclica, nutrientes escassos, presença de metal zinco tóxico, flutuação de ferro e poliaminas necessárias para sua sobrevivência e remoção através do fluxo menstrual. Desta forma, o parasito produz múltiplos fatores de virulência envolvidos na citoaderência, citotoxicidade, fagocitose, hemólise e evasão do sistema imunológico que permitem seu estabelecimento na região e aquisição de nutrientes necessários (FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012). Além disso, devido a sua

natureza microaerofílica, o parasito apresenta um sistema de detoxificação que permite neutralizar os efeitos do oxigênio no seu metabolismo e assim utiliza uma maquinaria enzimática completa presente no citoplasma e nos hidrogenossomos capaz de metabolizar EROs em moléculas inócuas (LEITSCH *et al.*, 2018).

A citoaderência é uma das principais vias de colonização, permitindo o trofozoíto aderir-se às células epiteliais da região urogenital e conduzir ao estágio crônico da infecção. O ambiente é naturalmente recoberto por uma camada protetora de muco, que proporciona uma barreira química e física para infecções através da produção de mucinas para inibição da adesão microbiana e produção de anticorpos secretados contra patógenos específicos (CURLIN e BURSAC, 2013). A fim de estabelecer a infecção, o parasito adere-se à camada de muco para penetrar a barreira através da produção de moléculas com atividade mucinolítica, denominadas de mucinases. Este processo ocorre por enzimas proteolíticas que degradam o muco produzido pelo hospedeiro permitindo o avanço na matriz e, com auxílio do movimento flagelar, é capaz de alcançar e danificar o complexo juncional das células hospedeiras (LEHKER e SWEENEY, 1999). Cinco proteínas de superfície, denominadas de adesinas, possuem a expressão aumentada durante este processo: AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23 (GARCIA *et al.*, 2003; MORENO-BRITO *et al.*, 2005; KUCKNOOR *et al.*, 2007). Quatro destas adesinas: AP120, AP65, AP51 e AP33 possuem função metabólica dependendo da sua localização hidrogenossomal e citoplasmática, sendo também denominadas de PFOR, enzima málica, α - e β -succinil-CoA sintetase, respectivamente. Quando localizadas na superfície podem atuar como receptores de hemoglobina e heme, e ainda participar de mecanismos de mimetismo molecular envolvidos na evasão imune, exceto a AP120, neste último caso (LEHKER e ALDERETE, 2000, ALDERETE *et al.*, 2001). Apenas para a AP23 ainda não foi identificada homologia com enzimas metabólicas. O trofozoíto apresenta em sua superfície lipofosfoglicano, abundante componente do glicocálice, que medeia a adesão do parasito às CEVs através da ligação a receptores de galectina-1 e 3 da célula hospedeira, além de estimular a modificação do parasito para a forma ameboide e modular a resposta inflamatória de células epiteliais e macrófagos (FICHOROVA *et al.*, 2006; MENEZES *et al.*, 2016). Além disso, proteínas do citoesqueleto (componentes de microtúbulos e microfilamentos), receptores de proteínas da matriz extracelular (laminina, fibronectina e colágeno) e processos de transdução de sinal e autofagia também possuem destaque neste

processo (FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012). A agressividade destes efeitos depende da virulência do isolado, expressão de proteínas de adesão e da concentração de ferro no meio, uma vez que este cátion desempenha um papel crítico por modular a expressão de fatores de virulência. Observa-se que isolados em condições de privação de ferro apresentam redução e supressão das enzimas envolvidas no metabolismo energético e proteólise (DE JESUS *et al.* 2007, TORRES-ROMERO e ARROYO, 2009). Além disso, estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o ferro modula a atividade e expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de purinas em *T. vaginalis* (PRIMON-BARROS *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2015).

Através de processos dependentes ou não de contato com as células humanas, o trofozoíto é capaz de causar injúria tecidual. Nos processos dependentes de contato, o parasito induz um processo de citotoxicidade resultante de uma cascata de eventos capazes de causar citólise, fagocitose e rompimento da monocamada celular e de células de defesa como os neutrófilos e macrófagos do hospedeiro (ALDERETE e PEARLMAN, 1984). Nos processos independentes, há secreção de diversas moléculas envolvidas no processo de dano celular, como TVF (do inglês *cell-free T. vaginalis culture fator*) que induz o arredondamento progressivo e aglomeração de células-alvo sem lise celular e CDF (do inglês *cell-detaching fator*) que é responsável pelo descolamento das células epiteliais, além da presença de proteases capazes de degradar proteínas do meio vaginal (FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012; MENEZES *et al.*, 2016). Através de mecanismos contatodependentes, o parasito é capaz de ingerir e destruir partículas sólidas em um processo denominado fagocitose. Este microrganismo possui capacidade de fagocitar lactobacilos de Doderlein, leucócitos, eritrócitos, leveduras, espermatozoides e fragmentos necróticos de células epiteliais vaginais, cervicais e prostáticas. Embora seja pouco elucidado, este mecanismo apresenta duas principais vias: presença de pseudópodes ao redor da célula-alvo ou através de processo de “afundamento”. Desta forma, a fagocitose pode ser considerada como um mecanismo de aquisição de ferro, lipídios, nucleotídeos e outros nutrientes, como também um mecanismo de virulência, aumentando a patogênese da infecção (PEREIRA-NEVES e BENCHIMOL, 2007, MIDDLE e BENCHIMOL, 2010, FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012).

Uma vez que a presença do parasito no sítio de infecção seja percebida pelas células do hospedeiro, estas respondem através de uma cascata de eventos denominada resposta inflamatória. Observa-se a secreção de diversas citocinas e quimiocinas pelas CEVs, como interleucina-8, interleucina-6 e proteína inflamatória de macrófagos (MIP-3 α), além de óxido nítrico produzido por neutrófilos e macrófagos (FICHOROVA, 2009). Em busca de controlar o avanço da infecção, o sistema imunológico humoral produz imunoglobulinas IgA, IgM e IgG, entretanto esses anticorpos geram uma proteção limitada ao *T. vaginalis*, pois os níveis decaem gradualmente após a erradicação da infecção em um período de seis a doze meses (MENEZES *et al.*, 2016). Considerando-se as constantes alterações no microambiente de infecção, o parasito desenvolveu mecanismos de defesa frente à resposta imunológica do hospedeiro, tais como: a) degradação das imunoglobulinas humanas através da ação das peptidases TvCP39 e TvCP60 (HERNANDEZ-GUTIERREZ *et al.*, 2004); b) degradação de proteínas do complemento por peptidases específicas da superfície do parasito (LEHKER e ALDERETE, 2000); c) variação fenotípica relacionada a imunógenos de superfície (P270 e P230), sendo que no primeiro ocorre alterações no epítipo de ligação do anticorpo enquanto que o segundo está relacionado à presença de vírus de RNA, concentração de ferro e fosforilação (LENKER e ALDERETE, 2000; ALDERETE, 1999); d) mimetismo molecular devido à presença de moléculas na superfície do parasito homólogas àquelas que recobrem células do hospedeiro (ALDERETE *et al.*, 2001); e) recobrimento com proteínas plasmáticas do hospedeiro a fim de impedir o reconhecimento pelo sistema imune; f) secreção de proteínas solúveis imunogênicas a fim de neutralizar anticorpos e linfócitos T citotóxicos (LEHKER e ALDERETE, 2000); e por fim, g) destruição das células imunes do hospedeiro, por indução à apoptose de neutrófilos e macrófagos (SONG *et al.*, 2008).

Entre as moléculas que participam da patogenicidade produzida pelo parasito, destaca-se a presença das peptidases. Este grupo de enzimas caracteriza-se pela clivagem proteolítica, ou seja, a quebra de ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, podendo ser classificado como endopeptidases, quando a quebra da ligação peptídica ocorre dentro da cadeia polipeptídica, ou como exopeptidases, quando a quebra ocorre na terminação amino ou carboxil da molécula. De acordo com o levantamento realizado por Arroyo *et al.* (2015), *T. vaginalis* apresenta cerca de 440 genes codificadores de proteases depositados em sua base de dados

(<http://www.trichdb.org/>) e através do mecanismo de catálise utilizado para ação proteolítica, pode-se classificar: 220 membros do tipo cisteína-, 123 metalo-, 80 serina-, 17 treonina- e 6 aspártico-peptidases (ARROYO *et al.*, 2015).

Em *T. vaginalis*, CPs são as enzimas proteolíticas mais expressas e podem ser classificadas em duas principais famílias: C1 (do tipo catepsina L) e C13 (do tipo *legumain*). CPs são fortemente reguladas pela presença de ferro e, assim, desempenham papéis importantes na patogênese da doença, envolvendo-se em mecanismos de virulência, como citoaderência, citotoxicidade, hemólise, resistência ao complemento, evasão do sistema imunológico e indução do mecanismo de apoptose de células humanas. Essas enzimas podem ser encontradas em diferentes compartimentos celulares, como lisossomo e membrana plasmática, ou ainda liberadas no meio de cultura e secreções vaginais de pacientes com tricomoníase aguda. *T. vaginalis* exibe fenótipos de virulência variados e um aumento na expressão dessas enzimas quando assumem o formato ameboide, indicando que as CPs são um dos fatores-chave no dano às células hospedeiras (HUANG *et al.*, 2012).

Serina-peptidases são amplamente distribuídas pela natureza, encontradas em diversos reinos animais e descritas em diferentes microrganismos. Em *T. vaginalis* já foram descritas 33 serina-peptidase do tipo subtilisina, com suas sequências depositadas no banco de dados do genoma, sendo que seis apresentam domínio extracelular ligado à membrana, em sua maioria há um domínio transmembrana que ancora proteínas e apenas duas têm um peptídeo sinal previsto para o tráfico intracelular (HERNÁNDEZ-ROMANO *et al.*, 2010). Atualmente, mais duas serina-peptidase intramembranais foram elucidadas neste parasito. TvROM1 e TvROM3 apresentam diferentes localizações subcelulares e especificidades de substrato que atuam em processos chaves para ocorrência da patogênese através da modulação da ligação e lise de células do hospedeiro (RIESTRA *et al.*, 2015).

Metalopeptidases já foram caracterizadas neste parasito, sendo diretamente envolvidas na patogênese da infecção como também presentes nos produtos de excreção e secreção do parasito, induzindo respostas nas células hospedeiras. Recentemente foi descrita a presença da TvMP50, uma MP imunogênica detectada durante a tricomoníase em amostra de soro de pacientes do sexo masculino. A atividade desta enzima é mediada por Zn^{2+} , principal cátion presente na interação com células prostáticas no microambiente urogenital masculino, sendo considerada

parte da família de efetores citolíticos envolvidos na patogenicidade do *T. vaginalis*, mediada por condições ambientais, como as porinas funcionais liberadas por baixo pH (PUENTE-RIVERA *et al.*, 2017).

II.3.2 Espécies reativas de oxigênio e metabolismo oxidativo

Organismos expostos ao oxigênio desenvolvem meios de metabolizá-lo a fim de transformá-lo em formas não danosas para seu metabolismo. No corpo humano, a concentração de oxigênio varia conforme o local, sendo que o intestino e as cavidades oral e vaginal apresentam concentrações de oxigênio inferiores do que o sangue e a maioria dos órgãos e, desta forma, competem aos microrganismos residentes adaptarem-se a essas variações (LEITSCH *et al.*, 2018). Parasitos que requerem uma pequena concentração de oxigênio e maior de dióxido de carbono para crescer são denominados de microaerofílicos e destacam-se *Entamoeba histolytica*, *G. duodenalis* e *T. vaginalis* e, uma vez que os mecanismos antioxidantes não sejam efetivos, ocorrerá desequilíbrio entre a produção e remoção de EROs, gerando estresse oxidativo. EROs são compostos químicos derivados da molécula de oxigênio, sendo que os tipos mais comuns incluem radical ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($HO\bullet$), e são danosos a componentes celulares, como enzimas, DNA, lipídios de membrana e outros (DROGE, W. 2002)

A localização do *T. vaginalis* predispõe o parasito a alterações nos níveis de nutrientes, concentração de oxigênio e metabolismo fermentativo, responsável pela geração de energia. O parasito é exposto a tais flutuações durante a transmissão, através da resposta imune celular como também por alterações no fluxo de sangue na região, como ocorre na menstruação (ELLIS *et al.*, 1992). Como forma de adaptação, os trofozoítos metabolizam o oxigênio em concentrações até 60 μM , reproduzindo o que é observado *in situ* (15 a 56 μM); no entanto, quando exposto a níveis superiores, ocorre rápida oxidação de domínios ferro-enxofre e de outras moléculas com baixo potencial redox, levando ao dano celular e morte (ELLIS *et al.*, 1994). No momento em que ocorre a difusão de oxigênio no interior do parasito, diversas enzimas são recrutadas a fim de minimizar seu efeito prejudicial à célula (Figura 2), entre elas, destacam-se: oxidase dependente de NADH, flavina redutase, superóxido dismutase, proteínas *flavodiiron* e flavoproteína contendo ferro-enxofre.

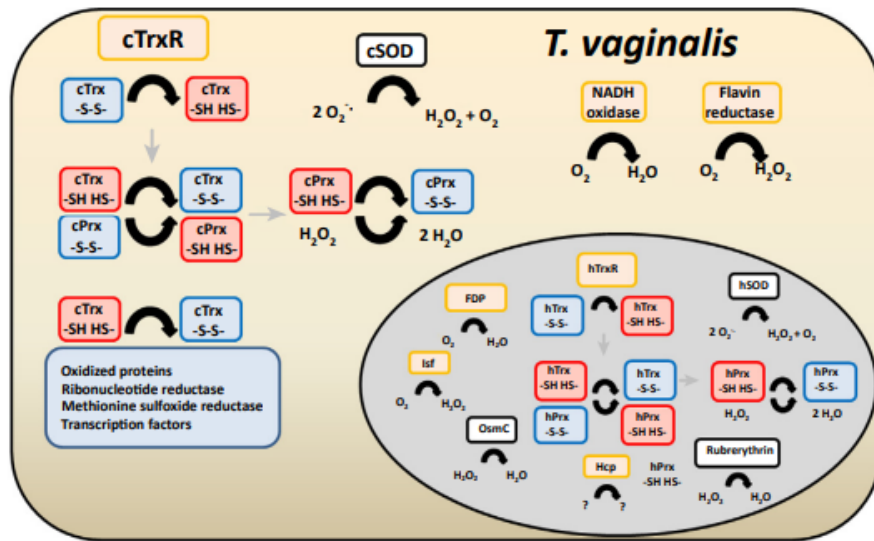


Figura 2: Vias redox no parasito microaerofílico *T. vaginalis*. TRX, tioredoxina redutase; PRX, peroxirredoxina; SOD, superóxido dismutase; FDP, proteínas *flavodiiron*; Isf, flavoproteína contendo ferro-enxofre; OsmC, proteína osmoticamente induzível. Imagem adaptada de Leitsch *et al.*, 2018 (número de autorização para uso: 4396470250483, Anexo 1).

Embora *T. vaginalis* não apresente mitocôndria, o consumo ativo de oxigênio decorre da presença de uma oxidase dependente de NADH (NADH ox) e de flavina redutase (FR) (TANABE, 1979). NADH ox é predominantemente citosólica e atua comoceptor de elétrons, reduzindo O_2 e gerando uma molécula de H_2O (RASOLOSON *et al.*, 2001). FR também surge neste cenário a fim de reduzir os danos da molécula de oxigênio. Esta enzima relaciona-se com a NADPH, apresentando a função de reduzir O_2 na presença do cofator mononucleotídeo de flavina (FMN); no entanto, apresenta H_2O_2 como produto final da via sendo necessário outras enzimas para continuar a catálise (LEITSCH *et al.*, 2018). Curiosamente, a atividade desta enzima é diminuída ou mesmo ausente em isolados clínicos resistentes ao MTZ (ELLIS *et al.*, 1992; LEITSCH *et al.*, 2012). Quando o oxigênio penetra no citoplasma do parasito, pode ocorrer a redução da molécula e produção da espécie reativa denominada de ânion superóxido (O_2^-). As principais enzimas destinadas à desintoxicação do superóxido são denominadas de SOD, e podem se apresentar em quatro diferentes classes: ligadas ao níquel, cobre, zinco ou ferro, sendo encontrada apenas a última classe em *T. vaginalis*. As enzimas SOD podem ser localizadas tanto no citoplasma quanto nos

hidrogenossomos e estão relacionadas com a capacidade de realizar a dismutação do ânion superóxido em oxigênio molecular O_2 e H_2O_2 (VISCOGLIOSI *et al.*, 1996 e HWANG *et al.*, 2002). Proteínas *flavodiiron* (FDP) também estão envolvidas na metabolização do oxigênio em *T. vaginalis*. Essas proteínas são consideradas modulares, uma vez que apresentam dois domínios funcionais separáveis sendo semelhantes à flavodoxina e outro à metalo- β -lactamase, além de um grupo funcional contendo FMN. A localização é hidrogenossomal e requer cofator FMN para exercer sua função protetora de redução do O_2 e formação de água (SMUTNÁ *et al.*, 2009). Por fim, a enzima flavoproteína contendo ferro-enxofre também apresenta um papel importante na detoxificação pela conversão de O_2 em água. Essa proteína está localizada nos hidrogenossomos e apresenta oxigênio, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e antibióticos de largo espectro, como MTZ e cloranfenicol, como aceptores de elétrons (SMUTNÁ *et al.*, 2014).

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) está entre as EROs que causam maior dano a microrganismos. Atuando como um oxidante mais reativo que o O_2 , difunde-se rapidamente pelas membranas causando oxidação de componentes celulares e enzimas, danos ao DNA e mutagênese, além de inibir processos de transporte de membrana (MILLER e BRITIGAN, 1997). Em *T. vaginalis*, já foi descrito sua afinidade ao ferro ferroso (Fe^{2+}), formado pela redução de Fe^{3+} e grupamentos tióis. Altas quantidades de Fe^{2+} no organismo microaerofílico leva à formação de radicais hidroxila (OH^\cdot), capaz de reagir com proteínas, membranas e ácidos nucleicos. A principal enzima da degradação do H_2O_2 é a catalase; no entanto, como está ausente em *T. vaginalis*, é substituída por peroxirredoxinas através de um mecanismo dependente de cisteinil através da redução da molécula reativa para H_2O (LEITSCH *et al.*, 2018). Peroxirredoxinas (PRX), tiorredoxina (Trx) e tiorredoxina redutase (TrxR) pertencem a um potente sistema antioxidante e localizam-se tanto no citoplasma quanto nos hidrogenossomos. TrxP e TrxR do parasito são bastante divergentes das proteínas homólogas em outros eucariotos, podendo atuar como potenciais alvos de terapia, como já descrito para o MTZ e outros fármacos da classe dos 5-nitroimidazóis, como tinidazol e ornidazol em *E. histolytica*, *T. vaginalis*, e *G. duodenalis* (COOMBS *et al.*, 2004; LEITSCH *et al.*, 2018). Além das peroxidases dependentes da tiorredoxina, recentemente foi descoberta uma nova classe de enzimas capazes de converter H_2O_2 em uma forma menos danosa à célula, denominada de rubreritina; entretanto, poucos estudos

demonstraram sua atividade (PÜTZ *et al.*, 2005). Nos últimos anos, foi descoberta mais uma enzima com atividade de peroxidase denominada de OsmC (proteína osmoticamente induzível, do inglês *osmotically inducible protein*) sendo responsável pela detoxificação do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos dentro do hidrogenossomo do parasito. A enzima funciona ligada a duas proteínas homólogas do complexo glicina descarboxilase: di-hidrolipoamida desidrogenase dependente de NADH (proteína homóloga L) e uma proteína transportadora de hidrogênio (proteína homóloga H) (NÝVLTOVÁ *et al.*, 2016).

II.4 Tratamento

A terapêutica para tricomoníase se baseia na utilização de medicamentos da classe dos 5-nitroimidazois, sendo que os únicos fármacos recomendados pelo FDA/EUA são o MTZ e tinidazol. De acordo com as últimas diretrizes publicadas nos Estados Unidos e no Reino unido, o tratamento preconizado ocorre via oral, 2 gramas em dose única ou 500 mg duas vezes ao dia por 7 dias, sendo o MTZ o fármaco de escolha (Domeika *et al.* 2010; Workowski *et al.*, 2015).

O pró-fármaco penetra no parasito e, por simples difusão, interioriza-se na organela responsável pela produção de energia, o hidrogenossomo. Na presença do MTZ, os elétrons produzidos pela PFOR e encaminhados pela ferredoxina serão direcionados para o MTZ e não para seu acceptor natural, hidrogenase. Uma vez que o fármaco seja ativado, a produção de hidrogênio é inibida e ocorre liberação de intermediários radicais-nitro tóxicos, que induzem a quebra da fita de DNA, levando à morte do parasito (KULDA, 1999).

Ambos os fármacos aprovados apresentam uma série de efeitos colaterais que incluem náuseas, vômitos, cefaleia, insônia, vertigem, sonolência e gosto metálico (CUDMORE *et al.*, 2004, ALI *et al.*, 2007). Há relatos que a administração destes medicamentos juntamente com bebidas alcóolicas podem causar uma hipersensibilidade denominada de “efeito-dissulfiram” ou “efeito-antabuse”, onde ocorrem convulsões, arritmias cardíacas e depressão respiratória que pode levar ao óbito (CINA *et al.*, 1996). Alguns pacientes podem desenvolver reações de hipersensibilidade do tipo alérgica, apresentando prurido, exantema, broncoespasmo e febre, nestes casos devem ser utilizados protocolos de dessensibilização e tratamento das alergias. Em casos onde há severa reação anafilática, essa classe

de medicamentos deve ser evitada. O uso de MTZ na gestação é recomendado pelo CDC, visto que mutagenicidade e teratogenicidade não foram comprovadas em estudos recentes (VIEIRA *et al.*, 2017). A utilização durante o período de amamentação requer cuidados de modo a reduzir a exposição do recém-nascido ao medicamento. Recomenda-se a interrupção do aleitamento materno de 12 às 24 h após a ingestão de 2 g de MTZ (KLEBANOFF *et al.*, 2001; VIEIRA *et al.*, 2017).

O primeiro relato de falha no tratamento com MTZ em paciente infectada por *T. vaginalis* ocorreu em 1962, três anos após a introdução do fármaco no mercado (ROBINSON, 1962). Atualmente é estimado que aproximadamente 2,5 a 9,6% dos casos de tricomoníase apresentem algum nível de resistência no tratamento com MTZ (SCHWEBKE E BARRIENTES, 2006). Considerando-se a alta prevalência mundial da tricomoníase, aproximadamente 187 milhões de casos, esta resistência torna-se um fator preocupante para a saúde pública.

O mecanismo de resistência aos 5-nitroimidazóis em *T. vaginalis* ainda não é completamente compreendido e vias aeróbica e anaeróbica têm sido propostas. A resistência clínica ocorre pela via aeróbica observada na presença de oxigênio, a qual reduz a toxicidade do MTZ pela re-oxidação dos ânions de radicais nitro, revertendo o MTZ à forma inativa e assim evitando o dano ao parasito (BRADIC *et al.*, 2017). Isolados clínicos de *T. vaginalis* resistentes ao MTZ têm atividade de remoção de oxigênio deficiente e, conseqüentemente, elevado níveis de oxigênio intracelular. Genes de enzimas como NADH oxidase-dependente e flavina redutase implicadas na resposta ao estresse de oxigênio estão envolvidos na resistência aeróbica ao MTZ (LEITSCH *et al.*, 2012; LEITSCH *et al.*, 2014). Em contraste, a resistência anaeróbica tem sido observada *in vitro*, marcada pela ausência de atividade de enzimas metabólicas do hidrogenossomo que usualmente ativam o MTZ, como PFOR e ferredoxina, bem como tioredoxina redutase citosólica (TrxR) (LEITSCH *et al.*, 2009). Recentemente Bradic *et al.* demonstraram SNPs (do inglês *single nucleotide polymorphism*) em genes ainda sem função definida, bem como em genes funcionalmente caracterizados relevantes no mecanismo de resistência aos fármacos, como PFOR (BRADIC *et al.*, 2017).

Considerando-se que os custos diretamente envolvidos com o tratamento da infecção por HIV contribuem para mais de 80% dos gastos relacionados a ISTs nos EUA, o papel de *T. vaginalis* na transmissão do HIV torna-se cada vez mais importante (OWUSU-EDUSEI *et al.*, 2013; QUINLIVAN *et al.*, 2012). Em termos

de coinfeção com HIV, Sorvillo *et al.* (1998) relataram uma taxa de 17,4% de detecção concomitante de tricomoníase em 212 mulheres HIV-soropositivas. Essa taxa foi cinco vezes maior do que a detecção de *Chlamydia trachomatis*. Outro estudo demonstrou que em um grupo de gestantes de Rwanda, as mulheres portadoras de HIV apresentavam maior suscetibilidade à infecção concomitante por *T. vaginalis* ou *Neisseria gonorrhoeae* (LEROY *et al.*, 1995). Laga *et al.* (1993) realizaram um estudo de coorte com profissionais do sexo inicialmente HIV-soronegativas por dois anos e determinaram maior probabilidade (1,9 vezes) para a soroconversão de HIV nas mulheres que adquiriram tricomoníase (LAGA *et al.* 1993). Nos EUA, um estudo estimou que 750 casos novos/ano de infecção pelo HIV são facilitados pela presença de *T. vaginalis*, gerando custos no sistema de saúde de aproximadamente U\$ 167 milhões por ano (CHESSON *et al.* 2004).

II.5 Fenantreno

Fenantreno é um hidrocarboneto aromático policíclico composto de três anéis de benzeno fundidos (Figura 3). Esse composto pode ser encontrado na natureza e compõe alguns dos opiáceos naturais e sintéticos, como o caso da morfina, codeína e naloxona (McCANN *et al.*, 2012).

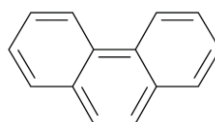


Figura 3: Estrutura básica do fenantreno.

A molécula pertence a um grupo de metabólitos secundários de plantas, como Annonaceae, Aristolochiaceae, Cannabaceae, Combretaceae, Dioscoreaceae, Euphorbiaceae, Juncaceae, Lauraceae, Malpighiaceae, Stemonaceae e Orchidaceae, sendo essa última a principal fonte de isolamento de fenantreno natural. A síntese natural ocorre através do acoplamento oxidativo de anéis aromáticos dos precursores do estilbeno. Diversas plantas produzem fitoalexinas, proteínas enzimáticas que tem a função de manter a parede celular vegetal livre de microrganismos. Fitoalexinas provenientes de orquídeas são fenantrenos e diidrofenantrenos que apresentam propriedades antimicrobianas

frente a vírus, bactérias e fungos (KOVÁCS *et al.* 2008). Derivados de fenantreno também têm sido investigados devido a outras atividades biológicas, incluindo efeitos antiproliferativos, anti-inflamatórios, antioxidantes, antialérgicos, espasmolíticos e ansiolíticos (TÓTH *et al.*, 2018).

II.5.1 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona)

A molécula aromática do fenantreno tem sido utilizada como base para síntese de diversos compostos com atividades biológicas distintas. Derivados heteroaromáticos que possuam a inserção de átomos de nitrogênio no anel aromático apresentam aumento da atividade antimicrobiana (HUSSEINI *et al.*, 1981).

A molécula 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona) (Figura 4A) apresenta-se altamente versátil do ponto de vista químico-farmacológico. Sua estrutura reúne características quinônicas, importantes pela propriedade redox, e possui propriedades de bases de Lewis devido à presença de um sítio diimínico capaz de atuar como quelante causando forte alteração na homeostasia e podendo levar à morte celular (CALDERAZZO *et al.*, 2002; CALUCCI *et al.*, 2006). Já foi demonstrada a ligação da fendiona a diferentes metais, como rutênio, cobalto, ósmio entre outros, e os quais são alvos de investigação antimicrobiana (SUBHAN *et al.*, 2014; TAY *et al.*, 2015). Ghosh *et al.* (2006) demonstraram que complexos de cobalto ligados a 1,10-fenantrolina ou fendiona intercalam pares de base do DNA e são capazes de clivar DNA plasmidial.

Entre seus derivados, a molécula fendiona pode ser ligada a metais como cobre (Cu^{2+}) e prata (Ag^+), respectivamente, $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($[\text{Cu}(\text{fendiona})_3]^{2+}$ ou Cu-fendiona) e $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$ ($[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]^+$ ou Ag-fendiona) (Figura 4B e 4C), e conferir uma maior atividade antimicrobiana, como observado para *Pseudomonas aeruginosa* e *Phialophora verrucosa* (VIGANOR *et al.*, 2016; GRANATO *et al.*, 2017). Estudos demonstram que o complexo $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3]^{2+}$ apresentou ação frente ao fungo multirresistente *Scedosporium apiospermum*, enquanto que a utilização de $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]^+$ demonstrou ser fortemente ativo frente à levedura *Candida albicans* (ESHWIKA *et al.*, 2004;

MCCANN *et al.*, 2012). Além disso, esses compostos podem ser inibidores de peptidases de microrganismos (JUAN-HUA *et al.*, 2014; MCKERROW *et al.*, 1999).

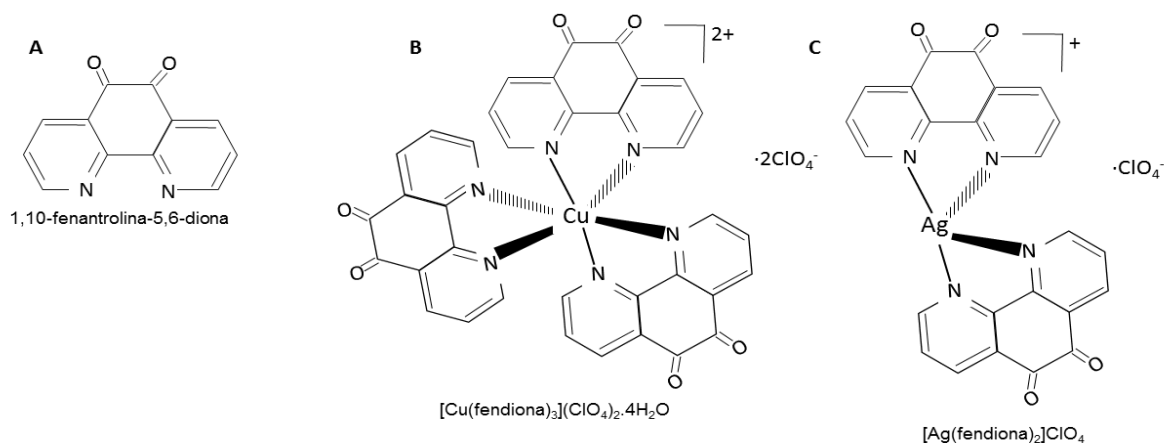


Figura 4: Estruturas químicas: (A) fendiona, (B) Cu-fendiona e (C) Ag-fendiona.

Estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo* foram realizados por diversos grupos a fim de avaliar a especificidade e segurança das moléculas. McCann *et al.* (2012) avaliaram a citotoxicidade dos compostos frente a diferentes linhagens celulares tumorais e normais e não observaram seletividade. Outro estudo verificou a efetividade dos compostos comparada a da cisplatina, potente agente antineoplásico utilizado na clínica, e valores de CC₅₀ inferiores ao fármaco de referência foram encontrados após 96 h de exposição. No entanto, também não foi observada seletividade frente às linhagens tumorais uma vez que agentes antiproliferativos potentes exibem seletividade limitada. Ainda, foi demonstrado que esses compostos não são capazes de intercalar nas fitas de DNA, não apresentando mutagenicidade nem genotoxicidade (DEEGAN *et al.*, 2006). Larvas de *Galleria mellonella* demonstraram maior tolerância aos compostos do que para cisplatina. O modelo foi utilizado para avaliação de toxicidade *in vivo*, uma vez que as larvas apresentam barreiras inatas semelhantes àsquelas encontradas em mamíferos, apresentando hemolinfa enriquecida de células de defesa. Da mesma forma, a avaliação utilizando camundongos demonstrou um perfil semelhante de tolerância, além do que não foi observado alteração nas enzimas hepáticas testadas após teste de toxicidade crônica (McCANN *et al.*, 2012).

A investigação destes compostos como promissores agentes antimicrobianos tem apresentado resultados promissores, como também na avaliação de segurança

frente à exposição. Considerando a dificuldade de tratamentos alternativos para tricomoníase, fendiona e seus derivados metálicos apresentam-se como possíveis agentes com atividade anti-*T. vaginalis*.

III. Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar a atividade anti-*T. vaginalis* do composto 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona) e seus derivados metálicos $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]^+$ e $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3]^{2+}$ visando estratégias terapêuticas para o controle da tricomoníase.

Objetivos específicos:

- Testar a atividade anti-*T. vaginalis* do composto fendiona ligado ou não a metais como cobre (Cu^{2+}) e prata (Ag^+);
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos frente à linhagem epitelial vaginal, fibroblastos e eritrócitos;
- Avaliar o efeito da associação do derivado mais ativo com MTZ;
- Investigar o tipo de morte celular envolvido no mecanismo de ação dos compostos;
- Testar o efeito dos compostos no metabolismo redox de *T. vaginalis*.

Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based metallodrugs and synergistic effect with metronidazole

Graziela Vargas Rigo, Brenda Petro Silveira, Michael Devereux, Malachy McCann, André Luis Souza dos Santos, 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 52 – 58.

Vargas Rigo G, Petro-Silveira B, Devereux M, McCann M, Souza dos Santos AL, Tasca T (2018). Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dionebased metallodrugs and synergistic effect with metronidazole. *Parasitology* 1–5. <https://doi.org/10.1017/S003118201800152X>

1,10-Phenanthroline-5,6-dione and its copper and silver derivatives induce oxidative damage and apoptotic-like death in *Trichomonas vaginalis*

Graziela Vargas Rigo, Brenda Petro Silveira, Júlia Biz Willig, Michael Devereux, Malachy McCann, André Luis Souza dos Santos, Tiana Tasca

O texto completo do capítulo II, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 62 -86, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição da investigação dos mecanismos de morte responsáveis pela atividade tricomonicida da fendiona livre e ligada a metais, cobre e prata.

VI. DISCUSSÃO

A resistência microbiana origina-se da tolerância natural dos microrganismos aos fármacos, como também na capacidade de adaptação frente à pressão natural ou causada pela intensa exposição a agentes biocidas. Como descrito pela OMS, resistência antimicrobiana é a capacidade de um microrganismo - seja bactéria, fungo ou parasito - de impedir que o antimicrobiano atue. Como resultado, a terapia torna-se ineficaz, ocorrendo a persistência da infecção e posterior transmissão do agente etiológico a outras pessoas. Fairlamb (2016) relata que patógenos microbianos eucariotos são os principais contribuintes para doenças e morte ao redor do mundo. Entre os mecanismos utilizados para escapar da resposta de medicamentos estão: falha ou inativação do fármaco, redução da concentração intracelular total do fármaco (menor captação e maior efluxo), sequestro do fármaco para longe de seu alvo, diminuição da afinidade do fármaco-alvo por mutação, redução do efeito do fármaco pela superexpressão do alvo, ou ainda vias para reparo a danos causados (FAIRLAMB *et al.*, 2016). Disseminadas por todo o mundo, infecções parasitárias são fortes ameaças a diversas comunidades, podendo ser transmitidas por vetores como na malária (*Plasmodium* spp.), doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e leishmaniose (*Leishmania* spp); ou pelo contato direto com o parasito como ocorre na esquistossomose (*Schistosoma mansoni*); na infecção através da ingestão, como na giardíase (*G. duodenalis*), toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*) e amebíase (*E. histolytica*); ou ainda através da transmissão venérea, como ocorre na tricomoníase (*T. vaginalis*).

Além de amplamente distribuída pelo mundo, a tricomoníase foi classificada pelo CDC/EUA como doença parasitária negligenciada, ou seja, infecção considerada endêmica em populações de baixa renda, e apresenta indicadores reduzidos de investimentos em pesquisa, produção de medicamentos e controle (SECOR *et al.*, 2014). A OMS divulgou em 2012 estudos de prevalência onde é demonstrado que 276,4 milhões de pessoas no mundo possuem esta infecção; no entanto, a inexistência de dados de vigilância somada à falta de recursos diagnósticos em diversos lugares torna este dado subestimado. Ainda, a infecção está associada a sérios problemas de saúde como infertilidade, complicações na gravidez, predisposição ao câncer cervical e prostático, além de ser facilitadora para a aquisição e transmissão de HIV (VAN DER POL *et al.*, 2007, POOLE & MCCLELLAND, 2013). Embora a tricomoníase seja considerada uma

infecção curável, são estimados que 10 milhões de pessoas infectadas necessitam tratamento alternativo aos 5-nitroimidazóis, como MTZ e tinidazol, os únicos fármacos aprovados pelo FDA (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). Após a inserção do MTZ como tratamento da tricomoníase em 1962, apenas três anos foram necessários para observar relatos de falha terapêutica. Além disso, a inexistência de surtos de resistência corrobora para a hipótese de tolerância natural em *T. vaginalis* a estes fármacos (CONRAD *et al.* 2012). Considerando a busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento desta IST, neste estudo foi avaliado o potencial anti-*T. vaginalis* de 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona) e seus derivados metálicos, $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3]^{2+}$ e $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]^+$. Atividades antimicrobianas promissoras utilizando estes compostos já foram descritas na literatura, no entanto não há estudos relacionando a atividade frente ao patógeno *T. vaginalis*.

Sendo assim, o capítulo I desta dissertação teve como objetivo a avaliação da atividade anti-*T. vaginalis* de fendiona e derivados metálicos frente a diferentes isolados de tricomonas, além da caracterização da seletividade destes compostos frente a células mamíferas. Estudos do nosso grupo demonstraram que diferentes isolados apresentam capacidades variadas de adesão a superfícies bióticas (células epiteliais vaginais) e abióticas (dispositivo intra-uterino e anel vaginal) de acordo com a expressão de adesinas e lipofosfoglicano, respectivamente (Santos *et al.* 2017). Além disso, o estudo realizado por Becker *et al.* (2015) revelou a ocorrência de isolados clínicos frescos de *T. vaginalis* infectados por simbiontes *Mycoplasma hominis* e vírus RNA dupla fita (*Trichomonasvirus*, TVV), assim como diferentes níveis de suscetibilidade ao MTZ.

Considerando o exposto, nosso estudo avaliou a suscetibilidade aos compostos levando em consideração a ocorrência de simbiose existente nos isolados e foram utilizados quatro isolados de *T. vaginalis* representativos: ATCC30236 co-infectado por *M. hominis* e TVV; TV-LACM22 apenas *M. hominis*; TV-LACH4 somente TVV e TV-LACM15 sem co-infecção com simbiontes. Levando-se em conta a média geométrica obtida entre os quatro isolados de *T. vaginalis* utilizados no estudo, observou-se que o composto fendiona apresentou um valor de MIC de 42,04 μM e um IC_{50} de 6,57 μM ; o derivado metálico Ag-fendiona demonstrou MIC de 21,02 μM e IC_{50} 2,84 μM enquanto que Cu-fendiona,

surpreendentemente exibiu um valor de MIC de 8,84 μM e IC_{50} de 0,87 μM , sendo estes inferiores aos valores de suscetibilidade obtidos para o atual fármaco de escolha para o tratamento, MTZ (MIC de 9,71 μM e IC_{50} 1,64 μM). A fim de avaliar o perfil de inibição dos compostos em ambas concentrações de MIC e IC_{50} na proliferação dos trofozoítos, foi realizada curva cinética de crescimento. Como observado na Figura 1 do primeiro capítulo, 12 horas são necessárias para total inibição do crescimento no IC_{50} , sendo que o efeito já é observado em apenas 2 horas de incubação para todos os compostos devido à redução significativa na quantidade de trofozoítos comparado ao controle não tratado. O tempo de 2 horas foi utilizado para a incubação dos experimentos realizados no capítulo II.

Além da notável atividade frente à *T. vaginalis* encontrada neste estudo, estes compostos vêm atraindo a atenção de pesquisadores por sua ação microbicida. Já foi demonstrada a atividade destes compostos frente ao fungo multirresistente *Scedosporium apiospermum* apresentando valores de IC_{50} de 0,15; 0,18 e 0,1 μM para fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona, respectivamente (McCANN *et al.*, 2012). Leveduras de *Candida albicans* também demonstraram suscetibilidade, apresentando valores de IC_{50} 2,9; 0,48 e 1,3 μM para fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona, respectivamente (McCANN *et al.*, 2004). Ainda, a atividade frente ao agente causador da cromoblastomicose, feohifomicose e micetoma, *Phialophora verrucosa*, foi determinado e obtido valores de MIC 12; 4,0 e 5,0 μM além de valores de IC_{50} 7,0; 2,4 e 1,8 μM , para fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona, respectivamente (GRANATO *et al.*, 2017). Além disso, foi demonstrada ação frente bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, agente causador de diversas infecções oportunistas severas em pacientes imunocomprometidos com valores de MIC para fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona de 31,15; 14,05 e 7,76 μM respectivamente. Os compostos também apresentaram capacidade de inibir a formação de biofilme de *P. aeruginosa*, reduzindo a biomassa (31%, 44% e 48%) e a viabilidade do biofilme (65%, 77% e 78%) (VIGANOR *et al.*, 2016).

No entanto, para que uma molécula seja considerada candidata para uma promissora ação como fármaco deve ser testada em modelos biológicos *in vivo*. Um passo prévio a este é testar a citotoxicidade *in vitro* almejando a seletividade da molécula, ou seja, atividade contra o patógeno e não para células do hospedeiro. Neste sentido, utiliza-se o cálculo do IS de um composto que

indicará se atoxicidade é seletiva para o agente infeccioso através da razão entre a concentração citotóxica 50% (CC₅₀) e o valor de IC₅₀ para microrganismo. Ainda não há consenso acerca do que é considerado o valor ideal de IS; no entanto, alguns estudos definiram que o índice utilizado *in vitro* para determinar seletividade na leishmaniose cutânea deve ser igual ou maior que 5,0, sendo então qualificado para seguir em estudos *in vivo* (GROGL *et al.*, 2013). Em outro estudo onde foi avaliada a atividade anti-*G. duodenalis*, *T. vaginalis*, *E. histolytica*, *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma cruzi* e *Mycobacterium tuberculosis*, autores determinaram que a eficácia biológica fosse considerada quando obtido valores de IS *in vitro* igual ou maior a 10 (NAVA-ZUAZO *et al.*, 2010). O IS para os compostos fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona avaliados no presente estudo foi determinado para três linhagens celulares mamíferas: HMVII, linhagem celular de fibroblastos (3T3-C1, não tumoral) e frente a eritrócitos humanos provenientes de doadores saudáveis. Para as células não tumorais (fibroblastos e eritrócitos) os compostos apresentam valores de IS superiores a 5,0, sendo considerados promissores na classificação de Grogl *et al.* (2013). O derivado Cu-fendiona apresentou os maiores índices para as mesmas linhagens, sendo encontrados valores de IS superiores a 10 e, de acordo com Nava-Zuazo *et al.* (2010), apresenta eficácia biológica, com potente e seletiva atividade antiparasitária, e assim, deve ser submetido a estudos *in vivo*.

É possível observar valores de IS inferiores a 5,0 para a linhagem tumoral HMVII. Estes resultados estão de acordo com a literatura, visto que a atividade anticâncer destes compostos frente a células de adenocarcinoma humano de rim (A-498) e de carcinoma hepatocelular humano (Hep-G2) já foi descrita (DEEGAN *et al.*, 2006). Além disso, McCann *et al.* (2012) já demonstraram que os compostos são bem tolerados nos ensaios *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella* e quando administrados intraperitonealmente em camundongos *Swiss* quando comparados com a cisplatina, agente antineoplásico utilizado na terapia do câncer. No entanto, fendiona e derivados metálicos não apresentaram influência no crescimento do tumor com as linhagens HepG2 e HCT-8 (células de carcinoma de cólon humano) (McCANN *et al.*, 2012).

Ainda no capítulo I foi observada a associação entre Cu-fendiona, o derivado mais potente frente a isolados de *T. vaginalis*, e o fármaco MTZ. Deste modo, este estudo demonstrou um novo composto com atividade promissora e a existência de

uma ação sinérgica quando utilizados Cu-fendiona (1,93 mg/L) em associação com MTZ (0,18 mg/L). Eshwika *et al.* (2004) descreveram uma interação favorável na utilização de doses não tóxicas de Ag-fendiona em combinação com miconazol ou anfotericina B uma vez que o composto estimula a respiração e produção de ergosterol, sendo necessárias concentrações menores dos fármacos para alcançar valores relevantes de MIC₉₀ para isolados de *Candida albicans*. Além disso, estudos vêm demonstrando resultados de sinergismo na atividade *anti-T. vaginalis* na combinação de compostos com MTZ, como pode ser observado para clotrimazol, tritripticina (um peptídeo antimicrobiano de 13 resíduos de amino ácidos) e derivados do ácido betulínico (DEBBIA *et al.*, 1996, INFANTE *et al.*, 2011, HÜBNER *et al.*, 2016).

O capítulo II desta dissertação teve o objetivo de investigar o mecanismo de morte gerado pelos compostos fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona no parasito *T. vaginalis*. A investigação dos mecanismos moleculares relacionados ao tipo de PCD tem sido muito utilizada em diversos campos da ciência a fim de determinar rotas de ação de moléculas com atividades biológicas. PCD ocorre em células submetidas a um agente fortemente estressor e, na tentativa de recuperar a integridade celular, ocorre a manifestação de determinadas formas morfológicas, bioquímicas e imunológicas que podem ser avaliadas e quantificadas (GALLUZZI *et al.*, 2016). Os resultados preliminares obtidos através de citometria de fluxo e microscopia eletrônica de varredura demonstram que durante o processo de morte, características importantes podem ser observadas, como: encolhimento do citoplasma, exposição de fosfatidilserina no lado externo da membrana plasmática, espalhamento da granulosidade, como também a formação de “blebbing” ou protrusões na membrana de *T. vaginalis*. Características semelhantes já foram descritas por Chose *et al.* (2002) quando foi realizado tratamento com estaurosporina, inibidor de proteínas quinases. O processo de apoptose é amplamente relacionado com mitocôndria, organela responsável pelo processo de respiração celular, produção de energia e liberação de moléculas capazes de ativar ou adiar o processo. No entanto, *T. vaginalis* é um protozoário amitocondriado que apresenta hidrogenossomos capazes de realizar funções semelhantes à mitocôndria a fim de realizar respiração celular e produzir energia. Neste sentido, Kaczanowski *et al.* (2011) reuniram diversas informações acerca da evolução de

mecanismos de morte semelhantes àqueles observados na apoptose em protozoários unicelulares, incluindo *T. vaginalis*. Maquinários importantes utilizados em células mitocondriadas, como endonuclease G e citocromo c estão ausentes neste parasito; no entanto, foi detectada a presença de homólogos putativos do fator de indução a apoptose (AIF), relacionada com flavoproteínas, tioredoxina redutase, óxido nítrico redutase e dihidrogenase redutase. Além disso, proteases do tipo caspase e fatores nucleares relacionados a este processo também foram descritos, como DNases ZEN1, NUC1 e TSN (CHOSE *et al.*, 2003a, KACZANOWSKI *et al.*, 2011).

O processo de apoptose já foi descrito em leveduras de *Candida albicans* quando expostas a 1,10-fenantrolina, precursora dos compostos utilizados neste estudo. No estudo de Coyle *et al.* (2004), 1,10-fenantrolina e complexos metálicos de cobre, prata e manganês apresentaram atividade fungicida e fungistática com perturbação na atividade mitocondrial e indução ao estresse oxidativo (COYLE *et al.*, 2004). Ainda neste contexto, já foi demonstrada vias de apoptose que independem da mitocôndria e são estritamente relacionadas com o desequilíbrio pró- e antioxidante (SINHA *et al.*, 2013). Assim, a capacidade de detoxificação no parasito foi investigada após tratamento com fendiona e derivados metálicos e um aumento significativo nas EROs foi observado.

Microrganismos microaerófilos apresentam necessidades diferenciadas de oxigênio em relação ao demais. Entre os parasitos humanos, destacam-se *E. histolytica*, *T. vaginalis* e *G. duodenalis*, os quais necessitam metabolizar o oxigênio proveniente do ar que é difundido para o citoplasma, como também moléculas derivadas do oxigênio produzidas por células do sistema imune do hospedeiro. *T. vaginalis* apresenta um arsenal enzimático dedicado a decompor as espécies danosas provenientes do oxigênio, como ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio em produtos não tóxicos a fim de evitar danos a enzimas, DNA e nos lipídeos de membrana. As enzimas responsáveis pela detoxificação localizam-se no citoplasma e dentro dos hidrogenossomos, como: NH, FR, SOD, FDP, ISF, OSMC, PR e RB (LEITSCH *et al.* 2018).

Através da técnica quantitativa de reação da polimerase em cadeia (qRT-PCR) foi possível avaliar a expressão gênica relativa das enzimas, utilizando como

normalizador o gene *DNATopII*, elencado por Santos *et al.* (2015) como um dos genes mais estáveis para este método. A partir dos resultados obtidos foi possível propor uma hipótese de mecanismo de ação dos compostos fendiona e derivados metálicos em *T. vaginalis*, conforme ilustrado na representação gráfica figura 6 do capítulo II. Os compostos foram capazes de reduzir a expressão gênica das enzimas NH, FR, SOD, ISF, OSMC e RB, enquanto que se observa o aumento da expressão de FDP. As enzimas NH, FR e SOD, principais enzimas citosólicas responsáveis pela metabolização do oxigênio proveniente do meio extracelular, apresentam expressão reduzida após o tratamento e, desta forma, o oxigênio difundido para o interior do trofozoíto sofrerá redução no ambiente citoplasmático e, conseqüentemente produzirá um intermediário altamente reativo, ânion superóxido. Além disso, estudos *in vitro* demonstram que Fe (II) é capaz de reduzir a molécula de oxigênio em superóxido e Fe (III), considerando a presença de redutores biológicos como ascorbato e compostos tiois. No entanto, apenas o ânion superóxido não é capaz de causar um grande dano ao DNA, porém foi demonstrado que durante condições de estresse *in vivo*, essa molécula é capaz de produzir “ferro livre” de moléculas contendo ferro, como observado na enzima Fe-SOD, e proteínas que contenham centro ferro-enxofre, como na enzima ISF, ambas pertencentes à via de detoxificação neste parasito (TOUATI *et al.*, 2000). Desta forma, o ânion superóxido favorece a reação de Fenton, reduzindo o ferro livre e levando à produção de radicais hidroxilas, moléculas danosas que rapidamente atacam proteínas, membrana e ácidos nucleicos (VALKO *et al.* 2005). O perfil de expressão das enzimas de detoxificação após tratamento com MTZ apresentou diferenças significativas. Como observado na Figura 5, as enzimas FR, SOD, ISF e FDP apresentaram a expressão gênica aumentada, demonstrando um modo de ação contrário àquele observado no tratamento dos compostos fendiona e derivados metálicos. Este resultado é relevante, considerando a busca de novos alvos terapêuticos para o tratamento da tricomoníase diferentes daqueles da classe dos 5-nitroimidazóis, evitando os mecanismos de resistência já conhecidos.

Estudos sobre o mecanismo de resistência ao MTZ têm sido focados em genes candidatos sabidamente envolvidos na remoção de oxigênio ou no metabolismo hidrogenossomal, como piruvato-ferredoxina oxidoreductase, ferredoxina, flavina redutase e tioredoxina (KULDA, 1999; LEITSCH *et al.*, 2014

UPCROFT *et al.*, 2001). Entretanto, alterações nesses genes não explicam todos os casos de resistência ao MTZ e nem todos esses genes tem sido identificados como possíveis candidatos. Neste contexto, a via de detoxificação tem sido alvo para estudos de possíveis alvos terapêuticos em diversos parasitos como *Plasmodium falciparum* e tripanossomatídeos uma vez que apresentam significativas diferenças para enzimas do hospedeiro, responsáveis pelo metabolismo redox (LEITSCH *et al.*, 2018). Sendo assim, a investigação do mecanismo de ação dos compostos abordados neste estudo com foco no metabolismo oxidativo revela um potencial alvo terapêutico em *T. vaginalis* a ser elucidado.

A tricomoníase é uma infecção que vem aumentando e demonstrando um perfil de cronicidade ao passo que diversas infecções não são corretamente diagnosticadas e tratadas, além dos milhares de casos onde o único tratamento disponível não é capaz de levar à cura clínica. O impacto na saúde pública vem se tornando cada vez mais evidente assim como os custos diretos e indiretos relacionados ao tratamento (SECOR *et al.*, 2014). O controle da infecção causada por *T. vaginalis* reduziria a ocorrência de diversas complicações em saúde, incluindo a redução na transmissão e aquisição do HIV, além da melhoria na qualidade de vida da mulher. Sendo assim, a atividade anti-*T. vaginalis* demonstrada pela fendiona e seus derivados metálicos, principalmente a ação observada para o composto Cu-fendiona, contribui fortemente na busca de alternativas terapêuticas para o tratamento desta infecção.

VII. CONCLUSÕES

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

1. O composto 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona) e seus derivados metálicos, Ag-fendiona e Cu-fendiona apresentaram atividade promissora frente a isolados de *T. vaginalis*;
2. O composto fendiona e derivados metálicos produziram efeitos na cinética de crescimento do parasito, com redução da proliferação quando testados na MIC em apenas 2 h de incubação e completa inibição do crescimento a partir de 6 h;
3. A suscetibilidade de diferentes isolados de *T. vaginalis* frente o composto Cu-fendiona apresenta valores de IC₅₀ inferiores do que aqueles observados para o MTZ;
4. Os compostos apresentaram adequados índices de seletividade *in vitro*, com destaque ao derivado Cu-fendiona que apresentou valores superiores a 10, caracterizando-o como promissor para seguir em testes *in vivo*;
5. Efeito sinérgico foi observado na associação de Cu-fendiona e MTZ;
6. Características semelhantes ao processo de morte por apoptose foram observadas nos trofozoítos após tratamento com Cu-fendiona;
7. Os compostos causaram aumento das espécies reativas de oxigênio e redução na expressão gênica em seis enzimas relacionadas à via de detoxificação do parasito.

VIII. PERSPECTIVAS

A fim de seguir na elucidação das vias de ação destes compostos, contribuindo para o entendimento do mecanismo de morte do parasito *T. vaginalis* e na busca por novas alternativas terapêuticas para a tricomoníase, este estudo tem como perspectivas, a curto prazo:

1. Análise da ultraestrutura de trofozoítos tratados com Cu-fendiona através de microscopia eletrônica de transmissão;
2. Avaliação do efeito dos compostos nas peptidases do parasito.

A médio e longo prazos, o estudo da caracterização da atividade anti-*T. vaginalis* do composto Cu-fendiona tem como perspectiva o desenvolvimento e caracterização de suspensões de nanocápsulas poliméricas mucoadesivas contendo Cu-fendiona veiculadas em hidrogel de quitosana, bem como a avaliação do efeito anti-*T. vaginalis* e antimicrobiano, o mecanismo de morte e ação após tratamento celular dessa formulação em modelos *in vitro* e *ex vivo* a fim de propor uma terapia inovadora para a tricomoníase.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERETE, J.F. Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunology*, v.67, pp.4298-4302, 1999.
- ALDERETE, J.F.; MILLSAP, K.W.; LEHKER, M.W.; BENCHIMOL, M. Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cell Microbiol*, v.3, n.6, p.359-370, 2001.
- ALDERETE, J.F.; PEARLMAN, E. Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. *Br J Vener Dis*. v.60, n.2, p.99-105, 1984.
- ALI, V.; NOZAKI, T. Current therapeutics, their problems, and sulfurcontaining-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasites. *Clinical Microbiology Rev*, v.20, n.1, p.164-187, 2007.
- ALVAREZ-SÁNCHEZ, M.E.; SOLANO-GONZÁLEZ, E.; YAÑEZ-GÓMEZ, C.; ARROYO, R. Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect*, v.9, n.14-15, p.1597-1605, 2007.
- ARROYO, R.; CÁRDENAS-GUERRA, R.E.; FIGUEROA-ÂNGULO, E.E.; PUENTE-RIVERA, J.; ZAMUDIO-PRIETO, O.; ORTEGA-LÓPEZ, J. *Trichomonas vaginalis* Cysteine Proteinases: Iron Response in Gene Expression and Proteolytic Activity López. *BioMed Research International*, v.2015, p.946787, 2015.
- BECKER, D.L.; SANTOS, O.; FRASSON, A.P.; RIGO, G.V.; MACEDO, A.J.; TASCA, T. High rates of double-stranded RNA viruses and *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* clinical isolates in South Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, v.34, p.181-187, 2015.
- BENCHIMOL, M. Trichomonads under microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, v. 10, n.5, p.528-550, 2004.
- BRADIC, M.; WARRING, S.D.; TOOLEY, G.E.; SCHEID, P.; SECOR, W.E.; LAND, K.M.; HUANG, P.J.; CHEN, T.W.; LEE, C.C.; TANG, P.; SULLIVAN, S.A.; CARLTON, J.M. Genetic Indicators of Drug Resistance in the Highly Repetitive Genome of *Trichomonas vaginalis*. *Genome Biology and Evolution*, v.9, n.6, p.1658-1672, 2017.
- BRUINS, M.J.; VAN STRAATEN, I.L.; RUIJS, G.J. Respiratory disease and *Trichomonas vaginalis* in premature newborn twins. *Pediatric Infection and Disease Journal*, v.32, n.9, p.1029-1030, 2013.
- CALDERAZZO, F.; PAMPALONI, G.; PASSARELLI, V. 1,10-phenanthroline-5,6-dione as a building block for the synthesis of homo- and heterometallic complexes. *Inorganic Chimica Acta*, v.330, n.1 p.136–142, 2002.
- CALUCCI, L.; PAMPALONI, G.; PINZINO, C.; PRESCIMONE, A. Transition metal derivatives of 1,10-phenanthroline-5,6-dione: controlled growth of Coordination polynuclear derivatives. *Inorganic Chimica Acta*, v.359, n.12, p.3911–3920, 2006.

- CHESSON, HW.; BLANDFORD, JM.; PINKERTON, SD. Estimates of the annual number and cost of new HIV infections among women attributable to trichomoniasis in the United States. *Sexual Transmitted Disease*, v.31, n.9, p.547-551, 2004.
- CHOSE O, NOËL C, GERBOD D, BRENNER C, VISCOGLIOSI E, ROSETO A. A form of cell death with some features resembling apoptosis in the amitochondrial unicellular organism *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Cell Research*, v. 276, n.1, p.32-9, 2002.
- CHOSE, O; SARDE, C.O.; GERBOD, D.; VISCOGLIOSI, E.; ROSETO, A.; Programmed cell death in parasitic protozoans that lacks mitochondria. *Trends in parasitology*, v.19, p. 559-564, 2003a.
- CHOSE, O.; SARDE, C.O.; NOËL, C.; GERBOD, D.; JIMENEZ, J.C.; BRENNER, C.; CAPRON, M.; VISCOGLIOSI, E.; ROSETO, A. Cell death in protists without mitochondria, *Annals of New York Academy Sciences*, v.1010, n.1, p.121-125, 2003b.
- CINA, S.J.; RUSSELL, R.A.; CONRADI, S.E. Sudden death due to metronidazole/ ethanol interaction. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, v.17, n.4, p.343-346, 1996.
- CONRAD M, GORMAN A, SCHILLINGER JA, FIORI PL, ARROYO R, MALLA N, DUBEY ML.; GONZALEZ J.; BLANK S.; SECOR WE.; CARLTON JM. Extensive Genetic Diversity, Unique Population Structure and Evidence of Genetic Exchange in the Sexually Transmitted Parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLOS Neglect Trop Dis*, v.6, n.3, p.e1573, 2012.
- COOMBS, G.H.; WESTROP, G.D.; SUCHAN, P.; PUZOVA, G.; HIRT, R.P.; EMBLEY, T.M.; MOTTRAM, J.C.; MÜLLER, S. The Amitochondriate Eukaryote *Trichomonas vaginalis* Contains a Divergent Thioredoxin-linked Peroxiredoxin Antioxidant System. *Journal of Biological Chemistry*, v.279, n.7, p.5249-5256, 2004.
- COTCH, MF.; PASTOREK, JG.; NUGENT, RP.; HILLIER, SL.; GIBBS, RS.; MARTIN, DH.; ESCHENBACH, DA.; EDELMAN, R.; CAREY, JC.; REGAN, JA.; KROHN, MA.; KLEBANOFF, MA.; RAO, AV.; RHOADS, GG. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Sexual Transmitted Disease*, v.24, n.6, p.353-360, 1997.
- COYLE, B.; KINSELLA, P.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M.; O'CONNOR, R.; CLYNES, M.; KAVANAGH, K. Induction of apoptosis in yeast and mammalian cells by exposure to 1,10-phenanthroline metal complexes. *Toxicology In Vitro*, v.18, n.1, p.63-70, 2004.
- CRUCITTI, T.; JESPERS, V.; MULENGA, C.; KHONDOWE, S.; VANDEPITTE, J.; BUVÉ, A. Non-sexual transmission of *Trichomonas vaginalis* in adolescent girls attending school in Ndola, Zambia. *PLoS One*, v.6, n.1, p.e16310, 2011.
- CUDMORE, S.L.; DELGATY, K.L.; HAYWARD-MCCLELLAND, S.F.; PETRIN, D.P.; GARBER, G.E. Treatment of infections caused by metronidazole- resistant

- Trichomonas vaginalis*. Clinical Microbiology. Reviews, v.17, n.4, p.783-793, 2004.
- CURLIN, M., BURSAC, D. Cervical mucus: from biochemical structure to clinical implications. *Frontiers in Bioscience*, v.5, p.507-515, 2013.
- DE JESUS, J.B.; CUERVO, P.; JUNQUEIRA, M.; BRITTO, C.; SILVA-FILHO, F.C.; SOARES, M.J.; CUPOLILLO, E.; FERNANDES, O.; DOMONT, G.B. A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics*, v.7, n.12, p.1961-1972, 2007.
- DEBBIA, E.A.; CAMPORA, U.; MASSARO, S.; BOLDRINI, E.; SCHITO, G.C. *In vitro* activity of metronidazole alone and in combination with clotrimazole against clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Chemotherapy*, v.8, n.2, p.96-101, 1996.
- DEBNATH, J.; BAEHRECKE, E.H.; KROEMER, G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy*, v.1, n.2, p.66-74, 2005.
- DEEGAN, C.; COYLE, B.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M.; EGAN, D.A. *In vitro* anti-tumour effect of 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione), [Cu(phendione)₃](ClO₄)₂·4H₂O and [Ag(phendione)₂]ClO₄ using human epithelial cell lines. *Chemical Biology Interaction*, v.164, n.1-2, p.115-25, 2006.
- DOMEIKA M, ZHURAUSSKAYA L, SAVICHEVA A, FRIGO N, SOKOLOVSKIY E, HALLEN A, UNEMO M, BALLARD RC. Guidelines for the laboratory diagnosis of trichomoniasis in East European countries, v.24, n.10, p.1125-1134, 2010.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiology Reviews*, v.82, n.1, p.47-95, 2002.
- DUNNE, RL.; DUNN, LA.; UPCROFT, P.; O'DONOGUHUE, PJ.; UPCROFT, JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res*, v.13, n4, p.239-249, 2003.
- DYALL, S.D.; JOHNSON, P.J.; Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, v.3, n.4, p.404-411, 2000.
- ELLIS, J.E.; COLE, D.; LLOYD, D. Influence of oxygen on the fermentative metabolism of metronidazole-sensitive and resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Biochemical Parasitology*, v.56, n.1, p.79-88, 1992.
- ELLIS, J.E.; YARLETT, N.; COLE, D.; HUMPHREYS, M.J.; LLOYD, D. Antioxidant defences in the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis* : comparison of metronidazole-resistant and sensitive strains. *Microbiology*, v.140, p.2489-2494, 1994.
- ESHWIKA, A.; COYLE, B.; DEVEREUX, M.; MCCANN, M.; KAVANAGH, K. Metal complexes of 1,10-phenanthroline- 5,6-dione alter the susceptibility of the yeast *Candida albicans* to amphotericin B and miconazole. *Biometals*, v.17, p.415-422, 2004.
- FAIRLAMB, A.H.; GOW, N.A.; MATTHEWS, KR.; WATERS, A.P. Drug resistance in eukaryotic microorganisms. *Natural Microbiology*, v.1, n.7, p.16092, 2016.

- FICHOROVA, R. N. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 83, p. 185-189, 2009.
- FICHOROVA, R. N.; TRIFONOVA, R. T.; GILBERT, R. O.; COSTELLO, C. E.; HAYES, G. R.; LUCAS, J. J.; SINGH, B. N. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infection and Immunity*, v. 74, p. 5773-5779, 2006.
- FIGUEROA-ÂNGULO, E.E.; RENDÓN-GANDARILLA, F.J.; PUENTE-RIVERA, J.; CALLA-CHOQUE, J.S.; CÁRDENAS-GUERRA, R.E.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; QUINTAS-GRANADOS, L.I.; ALVAREZ-SÁNCHEZ, M.E.; ARROYO, R. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection* v.14, p. 1411e1427, 2012.
- GALLUZZI, L.; BRAVO-SAN PEDRO, J.M.; KEPP, O.; KROEMER, G. Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cell Molecular Life Science*, v.73, n.11-12, p.2405-2410, 2016.
- GARCIA, A. F.; CHANG, T. H.; BENCHIMOL, M.; KLUMPP, D. J.; LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology*, v. 47, p. 1207-1224, 2003.
- GHOSH, S.; BARVE, A.C.; KUMBHAR, A.A.; KUMBHAR, A.S.; PURANIK V.G.; DATAR, P.A.; SONAWANE, U.B.; JOSHI, R.R. Synthesis, characterisation, X-ray structure and DNA photocleavage by cisdichloro bis(diimine) Co(III) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.100, n.3, p.331–343, 2006.
- Gilbert, RO.; Elia, G.; Beach, DH.; Klaessig, S.; Singh, BN. Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. *Infection and Immunology*, v.68, n.7, p.4200-4206, 2000.
- GRANATO, M.Q.; GONÇALVES, D.S.; SEABRA, S.H.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M.; DOS SANTOS, A.L.; KNEIPP, L.F. 1,10-Phenanthroline- 5,6-Dione– based compounds are effective indisturbing crucial physiological events of *Phialophora verrucosa*. *Frontiers in Microbiology*, v.8, p.76, 2017.
- GROGL, M.; HICKMAN, M.; ELLIS, W.; HUDSON, T.; LAZO, J. S.; SHARLOW, E. R.; JOHNSON, J.; BERMAN, J., SCIOTTI, R. J. Drug discovery algorithm for cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 88, n. 2, p. 216-221, 2013.
- HELMS, D.J.; MOSURE, D.J.; SECOR, W.E.; WORKOWSKI, K.A. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v.198, n.4, p.370-377, 2008.
- HERNANDEZ-GUTIERREZ, R.; AVILA-GONZALEZ, L.; ORTEGA-LOPEZ, J.; CRUZ-TALONIA, F.; GOMEZ-GUTIERREZ, G.; ARROYO, R. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39 kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental Parasitology*, v. 107, p. 125-135, 2004.

- HERNÁNDEZ-ROMANO, P.; HERNÁNDEZ, R.; ARROYO, R.; ALDERETE, J.F.; LÓPEZ-VILLASEÑOR. Identification and characterization of a surface-associated, subtilisin-like serine protease in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*, v.137, n.11, p.1621-35, 2010.
- HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E.; GINGER, C. D. Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters*, v. 141, p. 106-110, 1982.
- HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E.; GINGER, C. D. Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters*, v. 176, p. 55-60, 1984.
- HONIGBERG, B. M.; BRUGEROLLE, G. Structure. In: HONIGBERG, B. M. (Ed.). *Trichomonads Parasitic in Humans*. New York: Springer, p. 05-35, 1990.
- Huang, K.Y.; Huang, P.J.; Ku, F.M.; Lin, R.; Alderete, J.F.; Tang, P. Comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Trichomonas vaginalis* following adherence to fibronectin. *Infection and Immunity*, v.80, n.11, pp.900–3911, 2012.
- HÜBNER, D.P.G.; VIEIRA, P.B.; FRASSON, A.P.; MENEZES, C.B.; SENGER, F.R.; SILVA, G.N.S.; GNOATTO, S.C.B.; TASCA, T. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of betulinic acid derivatives. *Biomedical Pharmacotherapy*, v.84, p.476-484, 2016.
- HUSSEINI, H.S.; STRETTON, R.J., The antibacterial activity of some phenanthroline and phenanthrene compounds. *Microbios Letters*, v.16, p.85-94, 1981,
- HWANG, U.W.; SHIN, K.S.; RYU, J.S.; MIN, D.Y.; AHN, M.H. Phylogenetic relationships between the six superoxide dismutase proteins (FeSOD) of *Trichomonas vaginalis* and FeSOD6 genetic diversity. *Parasite*, v. 9, n.1, p.37-42, 2002.
- INCA, *Disponível em:*
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio
. Acesso em: 10 jun. 2018.
- INFANTE, V.V.; MIRANDA-OLVERA, A.D.; DE LEON-RODRIGUEZ, L.M.; ANAYA-VELAZQUEZ, F.; RODRIGUEZ, M.C.; AVILA, E.E. Effect of the antimicrobial peptide tritrypticin on the in vitro viability and growth of *Trichomonas vaginalis*. *Currents in Microbiology*, v.62, n.1, p.301-306, 2011.
- KACZANOWSKI, S.; SAJID, M.; REECE, S.E. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasite Vectors*, v.4, p.44, 2011.
- KISSINGER, P.; ADAMSKI, A. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. *Sexually Transmitted Infections*, v.89, n.6, p.426-433, 2013.
- KLEBANOFF, M.A.; CAREY, J.C.; HAUTH, J.C.; HILLIER, S.L.; NUGENT, R.P.; THOM, E.A.; ERNEST, J.M.; HEINE, R.P.; WAPNER, R.J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; MIODOVNIK, M.; SIBAI, B.M.; DORSTEIN, J.P.V.; DOMBROWSKI, M.P.; O'SULLIVAN, M.J.; VARNER, M.; LANGER, O.; MCNELLIS, D.; ROBERTS, J.M.; LEVENO, K.J. Failure of metronidazole to

- prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *New England Journal of Medicine*, v.345, n.7, p.487-493, 2001.
- KOVÁCS, A.; VASAS, A.; HOHMANN, J. Natural phenanthrenes and their biological activity. *Phytochemistry*, v.69, n.5, p.1084–1110, 2008.
- KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*, v.29, p.199-212, 1999.
- KUCKNOOR, A. S.; MUNDODI, V.; ALDERETE, J. F. The proteins secreted by *Trichomonas vaginalis* and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65. *Cell Microbiology*, v. 9, p. 2586–2597, 2007.
- LAGA, M.; MANOKA, A.; KIVUVU, M.; MALELE, B.; TULIZA, M.; NZILA, N.; GOEMAN, J.; BEHETS, F.; BATTER, V.; ALARY, M. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS*, v.7, n.1, p.95-102, 1993.
- LEHKER, M.W.; ALDERETE, J.F. Biology of trichomonosis. *Current Opinion of Infection Disease*, v.13, n.1, p.37-45, 2000.
- LEHKER, M.W.; SWEENEY, D. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sexual Transmitted Infection* v.75, p.231–238, 1999.
- LEITSCH, D.; DRINIC, M.; KOLARICH, D.; DUCHENE, M. Down-regulation of flavin reductase and alcohol dehydrogenase-1 (ADH1) in metronidazole-resistant isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.183, n.3, p.177–183, 2012.
- LEITSCH, D.; JANSSEN, B.D.; KOLARICH, D.; JOHNSON, P.J.; DUCHENE, M. *Trichomonas vaginalis* flavin reductase 1 and its role in metronidazole resistance. *Molecular Microbiology*, v.91, n.1, p.198–208, 2014.
- LEITSCH, D.; KOLARICH, D.; BINDER, M.; STADLMANN, J.; ALTMANN, F.; DUCHENE, M. *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Molecular in Microbiology*, v.72, n.2, p.518-536, 2009.
- LEITSCH, D.; WILLIAMS, C.F.; HRDÝ, I. Redox Pathways as Drug Targets in Microaerophilic Parasites. *Trends in Parasitology*, v.34, n.7, p.576-589, 2018.
- LEROY, V.; DE CLERCQ, A.; LADNER, J.; BOGAERTS, J.; VAN DE PERRE, P.; DABIS, F. Should screening of genital infections be part of antenatal care in areas of high HIV prevalence? A prospective cohort study from Kigali, Rwanda, 1992-1993. The Pregnancy and HIV (EGE) Group. *Genitourinary Medicine*, v.71, n.4, p.207-211, 1995.
- MASON, P.R.; FIORI, P.L.; CAPPUCINELLI, P.; RAPPELLI, P.; GREGSON, S. Seroepidemiology of *Trichomonas vaginalis* in rural women in Zimbabwe and patterns of association with HIV infection. *Epidemiology Infection*. v.133, n.2, p.315-323, 2005.

- MAVEDZENGE, S. N.; VAN DER POL, B.; CHENG, H.; MONTGOMERY, E. T.; BLANCHARD, K.; BRUYN, G.; RAMJEE, G.; VAN DER STRATEN, A. Epidemiological Synergy of *Trichomonas vaginalis* and HIV in Zimbabwean and South African Women. *Sexual Transmitted Disease*. v.37, n.7, p.460-6, 2010.
- MCCANN, M.; COYLE, B.; MCKAY, S.; MCCORMACK, P.; KAVANAGH, K.; DEVEREUX, M.; MCKEE, V.; KINSELLA, P.; O'CONNOR, R.; CLYNES, M. Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag(phendio)2]ClO₄ (phendio = 1,10-phenanthroline-5,6-dione) and its effects on fungal and mammalian cells. *BioMetals*, v.17, n.6, p.635–645, 2004.
- MCCANN, M.; SANTOS, ALS.; DA SILVA, BA.; ROMANOS, MTV.; PYRRHO, AS.; DEVEREUX, M.; KAVANAGH, K.; FICHTNER, I.; KELLETT, A. In vitro and in vivo studies into the biological activities of 1,10-phenanthroline, 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its copper(ii) and silver(i) complexes. *Toxicology Research*, v.1,p. 47-54, 2012.
- MCCLELLAND, R.S.; SANGARE, L.; HASSAN, W.M.; LAVREYS, L.; MANDALIYA, K.; KIARIE, J.; NDINYA-ACHOLA, J.; JAOKO, W.; BAETEN, J.M. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *Journal of Infection Disease*, v.195, n.5, p.698-702, 2007.
- MCKERROW, JH. Development of Cysteine Protease Inhibitors as Chemotherapy for Parasitic Diseases: Insights on Safety, Target Validation, and Mechanism of Action. *International Journal for Parasitology*, v.29, n.6, p.833-837, 1999.
- MENEZES, C.B.; FRASSON, A.P.; TASCA, T. Trichomoniasis – are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? *Microbial Cell*. v.3, n.9, p.404-419, 2016.
- MICHEL, R.; BORGES, F.; WILTUSCHNIG, R.; NEVES, F.; RIBEIRO, J.; VIEIRO, R.; VIEIRA, P. B.; BOHNS, G.; TASCA, T.; DE CARLI, G. A. Prevalência da tricomonose em mulheres residentes na Vila dos Papeleiros em Porto Alegre, RS. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.38, p.127–130, 2006.
- MIDDLEJ, V.; BENCHIMOL, M. *Trichomonas vaginalis* kills and eats--evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. *Parasitology*, v.137, p.65-76, 2010.
- MILLER, M.R.; NYIRJESY, P. Refractory Trichomoniasis in HIV-positive and HIV-negative Subjects. *Currents Infection in Disease Reproduction*, v.13, n.6, p.595-603, 2011.
- MILLER, R.A.; BRITIGAN, B.E.; Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clinical Microbiology Reviews*, v.10, n.1, p.1-18, 1997.
- Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Disponível: www.saude.gov.br. Acesso junho 2017.
- MITTEREGGER, D.; ABERLE, S.W.; MAKRISTATHIS, A.; WALOCHNIK, J.; BROZEK, W.; MARBERGER, M.; KRAMER, G. High detection rate of *Trichomonas vaginalis* in benign hyperplastic prostatic tissue. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 201, n.1, p.113-6, 2012.

- MORENO-BRITO, V.; YÁÑEZ-GÓMEZ, C.; MEZA-CERVANTEZ, P.; ÁVILA-GONZÁLEZ, L.; RODRÍGUEZ, M. A.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; ARROYO, R. A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cellular Microbiology*, v. 7, p. 245-258, 2005.
- MOODLEY, P.; CONNOLLY, C.; STURM, A.W. Interrelationships among human immunodeficiency virus type 1 infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis, and the presence of yeasts. *Journal of Infection and Disease*, v.185, n.1, p.69-73, 2002.
- NAVA-ZUAZO, C.; ESTRADA-SOTO, S.; GUERRERO-ALVAREZ, J.; LEÓN-RIVERA, I.; MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S.; CHAN-BACAB, M. J.; CEDILLO-RIVERA, R.; MOO-PUC, R.; MIRÓN-LÓPEZ, G.; NAVARRETEVAZQUEZ, G. Design, synthesis, and in vitro antiprotozoal, antimycobacterial activities of N-{2-[(7-chloroquinolin-4-yl) amino] ethyl}ureas. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 18, n. 17, p. 6398-6403, 2010.
- NÝVLTOVÁ, E.; SMUTNÁ T.; TACHEZY J.; HRDÝ I. OsmC and incomplete glycine decarboxylase complex mediate reductive detoxification of peroxides in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Biochemistry and Parasitology*, v.206, n.1-2, p.29-38, 2016.
- OFER, K.; GOLD, D.; FLESCHER, E. Methyl jasmonate induces cell cycle block and cell death in the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *International Journal of Parasitology*, v.38, n.8-9, p.959-68, 2008
- OWUSU-EDUSEI, K.J.; CHESSON, H.W.; GIFT, T.L.; TAO, G.; MAHAJAN, R.; OCFEMIA, M.C.; KENT, C.K. The estimated direct medical cost of selected sexually transmitted infections in the United States, 2008. *Sexually Transmitted Disease*, v.40, p.197-201, 2013.
- PEREIRA-NEVES, A.; BENCHIMOL, M. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol Cell*, v.99, n.2, p. 87-101, 2007.
- PEARLMAN, M.D.; YASHAR, C.; ERNST, S.; SOLOMON, W. An incremental dosing protocol for women with severe vaginal trichomoniasis and adverse reactions to metronidazole. *American Journal Obstetric Gynecology*, v. 174, p.934-936
- PETERSON, K.; DRAME, D. Iatrogenic transmission of *Trichomonas vaginalis* by a traditional healer. *Sexually Transmitted Infection*, v.86, n.5, p.353-354, 2010.
- PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, n.2, p.300-317, 1998.
- PFEFFER, C.M.; SINGH, A.T.K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Science*, v.19, n.2, p. E448, 2018 .
- POOLE, D.N.; MCCLELLAND, R.S. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually Transmitted Infection*, v.89, n.6, p.418-422, 2013.
- PRIMON-BARROS M, RIGO GV, FRASSON AP, SANTOS OD, SMIDERLE L, ALMEIDA S, MACEDO AJ, TASCA T. Modulatory effect of iron chelators on

- adenosine deaminase activity and gene expression in *Trichomonas vaginalis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.110, n.7, p.877-883, 2015
- PUENTE-RIVERA, J.; VILLALPANDO, J.L.; VILLALOBOS-OSNAYA, A.; VÁZQUEZ-CARRILLO, L.I.; LEÓN-ÁVILA, G.; PONCE-REGALADO, M.D.; LÓPEZ-CAMARILLO, C.; ELIZALDE-CONTRERAS, J.M.; RUIZ-MAY, E.; ARROYO, R.; ALVAREZ-SÁNCHEZ, M.E. The 50kDa metalloproteinase TvMP50 is a zinc-mediated *Trichomonas vaginalis* virulence factor. Molecular Biochemistry Parasitology, v.217, p.32-41, 2017.
- PÜTZ, S.; GELIUS-DIETRICH, G.; PIOTROWSKI, M.; HENZE, K. Rubrerythrin and peroxiredoxin: two novel putative peroxidases in the hydrogenosomes of the microaerophilic protozoon *Trichomonas vaginalis*. Molecular Biochemistry Parasitology, v.142, n.2, p.212-23, 2005.
- QUAN, J.H.; CHOI, I.W.; YANG, J.B.; ZHOU, W.; CHA, G.H.; ZHOU, Y.; RYU, J.S.; LEE, Y.H. *Trichomonas vaginalis* Metalloproteinase Induces mTOR Cleavage of SiHa Cells. Korean Journal of Parasitology, v.52, n.6, p.595-603, 2014.
- QUINLIVAN, E.B.; PATEL, S.N.; GRODENSKY, C.A.; GOLIN, C.E.; TIEN, H.C.; HOBBS, M.M.; Modeling the impact of *Trichomonas vaginalis* infection on HIV transmission in HIV-infected individuals in medical care. Sexually Transmitted Disease, v.39, n.9, p.671-677, 2012.
- RASOLOSON, D.; TOMKOVÁ, E.; CAMMACK, R.; KULDA, J.; TACHEZY, J. Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. Parasitology, v.123, n.1, p.45-56, 2001.
- RIESTR, A.M.; GANDHI, S.; SWEREDOSKI, M.J.; MORADIAN, A.; HESS, S.; URBAN, S.; JOHNSON, P.J. A *Trichomonas vaginalis* Rhomboid Protease and Its Substrate Modulate Parasite Attachment and Cytolysis of Host Cells. PLoS Pathogen, v.11, n.12, p.e1005294, 2015.
- ROBINSON, S.C. Trichomonal Vaginitis Resistant to Metranidazole. Can Med Assoc J. v.86, n.14, p.665, 1962.
- SANTOS, O; RIGO, G.V.; FRASSON, A.P.; MACEDO, A.J.; TASCA, T. Optimal Reference Genes for Gene Expression Normalization in *Trichomonas vaginalis*. PLoS One, v.10, p.e0138331, 2015.
- SANTOS, O.; RIGO, GV.; MACEDO, AJ.; TASCA, T. *Trichomonas vaginalis* clinical isolates: cytoadherence and adherence to polystyrene, intrauterine device, and vaginal ring. Parasitology Research, v.116, n.12, p.3275-3284, 2017.
- SCHWEBKE, J.R.; BARRIENTES, F.J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. Antimicrobial Agents of Chemotherapy, v.50, n.12, p.4209-4210, 2006.
- SCHWEBKE, J.R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. Clinical Microbiology Reviews, v. 17, p. 794-803, 2004.
- SECOR, W.E.; MEITES, E.; STARR, M.C.; WORKOWSKI, K.A. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.90, n.5, p.800-804, 2014

- SEÑA, A.C.; MILLER, W.C.; HOBBS, M.M.; SCHWEBKE, J.R.; LEONE, P.A.; SWYGARD, H.; ATASHILI, J.; COHEN, M.S. *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical Infection and Disease*, v. 44, n.1, p.13-22, 2007.
- SINHA, K.; DAS, J.; PAL, P.B.; SIL, P.C. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Achieves of Toxicology*, v.87, n.7, p.1157-1180, 2013.
- SMUTNÁ, T.; GONÇALVES, V.L.; SARAIVA, L.M.; TACHEZY, J.; TEIXEIRA, M.; HRDY, I. Flavodiiron protein from *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes: the terminal oxygen reductase. *Eukaryotic Cell*, v.8, n.1, p.47-55, 2009.
- SMUTNÁ, T.; PILAROVÁ, K.; TARÁBEK, J.; TACHEZY, J.; HRDÝ, I. Novel functions of an iron-sulfur flavoprotein from *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.58, n.6, p.3224-3232, 2014.
- Song, H.O.; Shin, M.H.; Ahn, M.H.; Min, D.Y.; Kim, Y.S.; Ryu, J.S. *Trichomonas vaginalis*: reactive oxygen species mediates caspase-3 dependent apoptosis of human neutrophils *Experimental Parasitology*, v.118, n.1, pp.59-65, 2008.
- SORVILLO, F.; KOVACS, A.; KERNDT, P.; STEK, A.; MUDERSPACH, L.; SANCHEZ-KEELAND, L. Risk factors for trichomoniasis among women with human immunodeficiency virus (HIV) infection at a public clinic in Los Angeles County, California: implications for HIV prevention. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.58, n.4, p.495-500, 1998.
- SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. *Emerging Infection Disease*, v.7, n.6, p.927-32, 2001.
- SUBHAN, M.A.; SAIFUR RAHMAN, M.; ALAM, K.; MAHMUD HASAN, M. Spectroscopic analysis, DNA binding and antimicrobial activities of metal complexes with phendione and its derivative. *Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.118, p.944-50, 2014.
- SUTCLIFFE, S. Sexually transmitted infections and risk of prostate cancer: review of historical and emerging hypotheses. *Future Oncology*, v.6, n.8, p.1289-1311, 2010.
- TANABE, M. *Trichomonas vaginalis*: NADH Oxidase Activity. *Experimental Parasitology*, v.48, p.135-143, 1979.
- TAY, C.X.; QUAH, S.Y.; LUI, J.N.; YU, V.S.; TAN, K.S. Matrix Metalloproteinase Inhibitor as an Antimicrobial Agent to Eradicate *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod*, v.41, n.6, p.858-863, 2015.
- TORRES-ROMERO, J. C.; ARROYO, R. Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, p. 1065-1074, 2009.
- TÓTH, B.; HOHMANN, J.; VASAS, A. Phenanthrenes: A Promising Group of Plant Secondary Metabolites. *Journal of natural products*, v.81, n.3, p.661-678, 2018.

- TOUATI D. Iron and oxidative stress in bacteria. *Achieves in Biochemical and Biophysics*, v.373, n.1, p.1-6, 2000.
- UPCROFT, P.; UPCROFT, J.A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews*, p.14, n.1, p.150-164, 2001.
- VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicine Chemistry*, v.12, p.1161-1208, 2005.
- VAN DER POL, B. *Trichomonas vaginalis* infection: The most prevalent nonviral sexually transmitted infection receives the least public health attention. *Clinical Infectious Diseases*, v. 44, p. 23-25, 2007.
- VIEIRA PB, SILVA NL, KIST LW, OLIVEIRA GM, BOGO MR, CARLI GA, MACEDO AJ, TASCA T. Iron from haemoglobin and haemin modulates nucleotide hydrolysis in *Trichomonas vaginalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.110, n.2, p.201-208, 2015.
- VIEIRA, PB.; TASCA, T.; SECOR, WE. Challenges and Persistent Questions in the Treatment of Trichomoniasis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.17, n.11, p.1249-1265, 2017.
- VIGANOR, L.; GALDINO, A.C.; NUNES, A.P.; SANTOS, K.R.; BRANQUINHA, M.H.; DEVEREUX, M.; KELLETT, A.; MCCANN, M.; SANTOS, A.L. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of 1,10-phenanthroline- based drugs against both planktonic- and biofilm-growing cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.71, n.1, p.128-34, 2016.
- VIIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncology*, v.39, n.1, p.71-5, 2000.
- VISCOGLIOSI, E.; DURIEUX, I.; DELGADO-VISCOGLIOSI, P.; BAYLE, D.; DIVE, D. Phylogenetic implication of iron-containing superoxide dismutase genes from trichomonad species. *Molecular Biochemistry in Parasitology*, v.80, n.2, p.209-214, 1996.
- WORKOWSKI KA, BOLAN GA. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recommen Rep*, v.64, Rr-03, p.1-137, 2015.
- WHO. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections: 2008: World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, 2012 ISBN 978 92 4 150383 9. *Reproductive health matters*, v.20, n.40, p.207-209, 2012.
- ZHANG, Z.F.; BEGG, C.B. Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. *International Journal of Epidemiology*, v.23, n.4, p.682-90, 1994.

X.1 Anexo 1: Autorização para uso de imagem como figura 2 da seção Estado da Arte.

05/08/2018

RightsLink Printable License

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 05, 2018

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

License Number	4396470250483
License date	Jul 26, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Trends in Parasitology
Licensed Content Title	Redox Pathways as Drug Targets in Microaerophilic Parasites
Licensed Content Author	David Leitsch,Catrin F. Williams,Ivan Hrdý
Licensed Content Date	Jul 1, 2018
Licensed Content Volume	34
Licensed Content Issue	7
Licensed Content Pages	14
Start Page	576
End Page	589
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Original figure numbers	Figure 1
Title of your thesis/dissertation	Caracterização da atividade anti-Trichomonas vaginalis de derivados de 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona)
Expected completion date	Aug 2018
Estimated size (number of pages)	100
Requestor Location	Miss. Graziela Rigo Av Ipiranga 2752 Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90610-000 Brazil Attn: Miss. Graziela Rigo
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD

