

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

Ação do cobre-fendiona frente ao protozoário *Trichomonas vaginalis* e agentes causadores de vaginite infecciosa: mecanismo de ação multialvo e desenvolvimento de formulação nanotecnológica intravaginal

Doutoranda: Graziela de Vargas Rigo

Orientadora: Prof^a. Dr. Tiana Tasca

Coorientador: Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos

Porto Alegre, 18 abril de 2022.

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

Ação do cobre-fendiona frente ao protozoário *Trichomonas vaginalis* e agentes causadores de vaginite infecciosa: mecanismo de ação multialvo e desenvolvimento de formulação nanotecnológica intravaginal

Tese apresentada por Graziela de Vargas Rigo para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr. Tiana Tasca

Coorientador: Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos

Porto Alegre, 18 abril de 2022.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de
Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em
18.04.2022, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Danielle da Silva Trentin

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dr. Letícia Cruz

Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dr. Marta Helena Branquinha de Sá

Universidade Federal do Rio de Janeiro

CIP - Catalogação na Publicação

Rigo, Graziela de Vargas
Ação do cobre-fendiona frente ao protozoário
Trichomonas vaginalis e agentes causadores de vaginite
infecciosa: mecanismo de ação multialvo e
desenvolvimento de formulação nanotecnológica
intravaginal / Graziela de Vargas Rigo. -- 2022.
236 f.
Orientadora: Tiana Tasca.

Coorientador: André Luis Souza dos Santos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2022.

1. Trichomonas vaginalis. 2. cobre-fendiona. 3.
microbiota vaginal. 4. metabolismo oxidativo e
peptidases. 5. nanotecnologia. I. Tasca, Tiana,
orient. II. Santos, André Luis Souza dos, coorient.
III. Título.

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

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Pesquisa em Parasitologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no Laboratório de Biofilmes e Biodiversidade Microbiana do Centro de Biotecnologia da UFRGS e no Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Durante todo o trabalho foi recebido bolsa de estudos do CNPq.

Agradecimentos

A concretização desta tese 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.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado que permitiu minha dedicação exclusiva a este trabalho.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite.

À minha querida família GPTrico, que me recebeu como recém-ingressa no curso de Farmácia e me acompanhou ao longo de 11 anos para concretizar o sonho de me tornar Doutora em Ciências Farmacêuticas. Sou muito grata pelo alicerce firme que a pesquisa e o grupo me proporcionaram ao longo dos anos, tanto no desenvolvimento profissional quanto pessoal. 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 da minha tese. À Ju, Miche, Márcia, Brenda e aos diversos colegas de pesquisa que me ajudaram a trilhar o caminho da pós-graduação, seria impossível sem o apoio e a parceria de vocês. Agradeço ao nosso atual grupo pela maravilhosa convivência. Em especial ao Saulo, Corina, Giulia e Fê pela amizade construída ao longo deste período, por dividirem comigo comemorações e frustrações da rotina. Agradeço em especial à Fê pelo otimismo, disposição e interesse em me auxiliar nos experimentos. Tua ajuda foi muito importante para concretização desta etapa.

À Prof^ª Dr. Tiana Tasca, um agradecimento em especial por ser uma pessoa tão importante na minha vida ao longo desses 11 anos. Te agradeço por acreditar na minha capacidade e por todos os ensinamentos que culminam com essa tese. Obrigada pela tua energia, incentivos, puxões de orelha, paciência e, sobretudo, pela amizade incondicional. 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 tua aluna.

Ao Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos, pela coorientação e competência científica para realização deste projeto, bem como pela disponibilidade e amizade demonstradas. Espero que os dois grupos ainda possam, juntos, contribuir muito para a ciência.

Ao Prof. Dr. Alexandre Macedo e seu grupo de pesquisa que, especialmente no último ano, receberam a mim e parte do grupo de braços abertos, demonstrando espírito de equipe e disponibilidade em auxiliar. Agradeço especialmente à Dayse, Rodrigo e a Flávia pelo incentivo e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

A todos os colaboradores e coautores desta tese, agradeço a dedicação e comprometimento. Em especial para Luiza Frank, pela amizade construída aos longos dos anos, pela parceria e pelo aprendizado.

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 Angélica que, além de uma amiga muito especial e colaboradora, compartilha as frustrações e alegrias da vida de pós-graduandas.

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

Ao Jonas, meu namorado, por permanecer ao meu lado nesta etapa e por todo incentivo, amor, carinho e paciência. Obrigada por ser meu suporte, juntamente com a nossa Pipa. Ao Cláudio e a Lena, meus sogros, por todo o apoio e torcida para realização deste sonho.

Agradeço especialmente a minha família que sempre me incentivou a concretizar o sonho do doutorado. À minha irmã Francine, 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

A tricomoníase é a infecção sexualmente transmissível (IST) de origem não viral mais comum no mundo com uma incidência de 156 milhões de novos casos, capaz de atuar como facilitador da aquisição de HIV e causar disbiose vaginal. Apesar de ser considerada uma IST curável, as falhas terapêuticas incluem a resistência dos isolados de *T. vaginalis* aos fármacos 5-nitroimidazóis, estimada em aproximadamente 10%. Efeitos antimicrobianos da fendiona complexada ou não a metais, como prata e cobre, vêm demonstrando potente atividade antimicrobiana. A ação do cobre-fendiona merece destaque pela promissora atividade anti-*T. vaginalis* e alto índice de seletividade, como descrito em trabalho anterior do grupo. Sendo assim, o objetivo deste estudo envolveu a caracterização do mecanismo de ação do cobre-fendiona frente ao *T. vaginalis*, efeito frente a outros agentes causadores de vaginite e o desenvolvimento de uma formulação nanotecnológica intravaginal contendo ativo cobre-fendiona com atividade tricomonicida. O complexo cobre-fendiona causou a morte do parasito pela ativação de vias de morte celular semelhantes à apoptose. O metabolismo oxidativo foi significativamente reduzido devido à diminuição na função e expressão gênica de enzimas responsáveis pela detoxificação, levando a um desequilíbrio da homeostasia. O composto também apresentou efeito frente às peptidases, reconhecidas como fatores de virulência na infecção por *T. vaginalis*, com redução da capacidade proteolítica do protozoário e interação com as metalopeptidases TvMP50 e TvGP63. A diminuição da virulência do parasito foi demonstrada pela redução da citotoxicidade contra células epiteliais vaginais exercida por parasitos pré-tratados com cobre-fendiona. O efeito do composto frente a espécies de *Candida*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus agalactiae* destaca seu potencial antimicrobiano frente a microrganismos responsáveis por vaginite. Além disso, foi demonstrado o desenvolvimento de formulação nanotecnológica contendo cobre-fendiona como molécula ativa, que apresenta importantes vantagens devido seu efeito multialvo frente a isolados de *T. vaginalis*.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*; microbiota vaginal; cobre-fendiona; metabolismo oxidativo; peptidases; nanotecnologia

ABSTRACT

Trichomoniasis is the most common non-viral sexually transmitted infection (STI) with an incidence of 156 million new cases, capable of acting as facilitator of HIV acquisition and causing vaginal dysbiosis. Although trichomoniasis is considered a curable STI, therapeutic failures include resistance of *T. vaginalis* isolates to 5-nitroimidazole drugs, nearly 10%. Antimicrobial effects of phendione complexed or not to metals such as silver and copper has demonstrated potent antimicrobial activity. Cu-phendione action should be highlighted due to promising anti-*T. vaginalis* activity and high selectivity index, previously demonstrated by the group. Therefore, the objective of this study involved the characterization of action mechanism of Cu-phendione against *T. vaginalis*, the effect against other agents that cause vaginitis and the development of an intravaginal nanotechnology formulation containing active Cu-phendione with trichomonocidal activity. The Cu-phendione complex led the parasite to death by activating apoptosis-like cell death pathways. Oxidative metabolism was significantly reduced due to decreased function and gene expression of enzymes responsible for detoxification, leading to homeostasis imbalance. Compound also had an effect against peptidases, recognized as virulence factors in *T. vaginalis* infection, through reduced proteolytic capacity, with special interaction with TvMP50 and TvGP63 metallopeptidases. The decrease in parasite virulence was demonstrated by the cytotoxicity reduction against vaginal epithelial cells exerted by parasites pretreated with Cu-phendione. The effect of Cu-phendione against *Candida* species, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus agalactiae* highlights the antimicrobial potential against microorganisms responsible for vaginitis. In addition, demonstrated the development of a nanotechnological formulation containing copper-phendione as active molecule, which has important advantages due to multi-target effect against *T. vaginalis* isolates.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*; vaginal microbiota; copper-phendione; oxidative metabolism; peptidases; nanotechnology

LISTA DE FIGURAS

Estado da arte

- Figura 1** Características morfológicas de *T. vaginalis*.....32
Figura 2: Vias redox no parasito microaerofilico *T. vaginalis*.....35
Figura 3: Estruturas da molécula de fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona.....44

Capítulo I

- Figura 1:** Flowchart of the research carried out for the analysis of articles (Pubmed), patents (Espacenet), and clinical trials.....57
Figure 2: Worldwide distribution planisphere of new approaches developed treating of trichomoniasis reviewed in this study.....58
Figure 3: Venn diagram demonstrates the overlapping of patent applicant origin.....76
Figure 4: Translational research on drug development against the parasite *Trichomonas vaginalis*, from laboratory bench to bedside81

Capítulo II

- Figure 1:** Reactive oxygen species in *T. vaginalis* produced during treatment with metronidazole (MTZ), phendione (Ph), silver-phendione (APh), and Cu-phendione (CPh).....100
Figure 2: Antioxidant gene expression in *T. vaginalis* treated 2h with metronidazole (MTZ), phendione (Ph), silver-phendione (APh), and Cu-phendione (CPh). (A) Flavin reductase; (B) Flavodiiron protein; (C) Iron-sulfur flavoprotein; (D) NADH oxidase; (E) OsmC homologue; (F) Rubrerythrin and (G) Superoxide dismutase.....102
Figure 3: Flow cytometry analysis of untreated (A) or treated 2h with Cu-phendione.....104
Figure 4: Apoptosis gene expression in *T. vaginalis* treated with compound 3. PARP: Poly [ADP-Ribose] Polymerase; APLT-1: Aminophospholipid translocase.....106
Figure 5: Interaction of PARP (A) and APLT-1 (B) by STRING 11.0.....108

Capítulo III

- Figure 1:** Azocasein cleavage rate by trophozoites treated or not with the Cu-phendione compound (CPh).124
Figure 2: Profile of substrates Phe-Arg (A) and MMP (B) by *T. vaginalis*. CTL: Untreated control. Phe: 1,10-Phenanthroline. CPh: Cu-phendione.125
Figure 3: Zimogram of the effect of Cu-phendione molecule on *T. vaginalis* peptidases.....126
Figure 4: Analysis of the expression of mRNA relative to the reference gene (DNATopII) of *T. vaginalis* treated with Cu-phendione.128
Figure 5: Three-dimensional model for TvMP50.....130
Figure 6: Three-dimensional model for TvGP63.....131
Figure 7: Anchorage site with lower absolute energy (kcal/mol) and 3D interaction diagram of the compounds with the amino acids of TvMP50 and TvGP63.....133
Figure 8: LDH release by the HMVII cell lineage after contact with *T. vaginalis* (ATCC 30236) treated or not with Cu-phendione (CPh).....136

Capítulo IV

Figure. 1. Growth and biofilm formation by used *Candida albicans* (A), *C. glabrata* (B), *C. tropicalis* (C), *C. krusei* (D), *C. parapsilosis* (E), *Streptococcus agalactiae* (F), *Staphylococcus aureus* (G), and *Enterococcus faecalis* (H) in the presence of increasing Cu-phendione concentration, 96.4 to 0.18 µg/mL.....150

Capítulo V

Figura 1: Estrutura química da molécula cobre-fendiona.....159
Figura 2: Gráfico radar do diâmetro médio (D[4,3]) e os percentis 10, 50 e 90, apresentados em volume e número.....163
Figura 3: Distribuição dos diâmetros das nanocápsulas contendo cobre-fendiona pela técnica de rastreamento de partículas.....165
Figura 4: Viabilidade dos trofozoítos de *T. vaginalis* ATCC 30236 após 24h de tratamento com Ph, NC-CPh e NC.....167
Figura 5: Distribuição do tamanho de partícula do hidrogel contendo somente os polímeros pectina (1%) e quitosana (2%) (verde) e hidrogel contendo nanocápsulas (NC) (vermelho).....168
Figura 6: Análise de viscosidade de hidrogel de pectina e quitosana livre (HG) e na presença de nanocápsulas (HG-NC).....169
Figura 7: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de (A) hidrogéis de quitosana e pectina, (B) hidrogéis de quitosana e pectina contendo nanocápsulas.....169

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Table 1: Basic research on promising molecules for the treatment of trichomoniasis of natural and synthetic origin, as well as nanotechnology approaches.....	59
Table 2: Solution or technology for treating trichomoniasis proposed by patents.....	74
Table 3: Clinical trials testing potential new alternatives to treat trichomoniasis.....	79

Capítulo II

Table 1: Effects of phendione and its derivatives on size and granularity of <i>T. vaginalis</i>	104
---	-----

Capítulo III

Table 1: Parameters used for qRT-PCR of <i>T. vaginalis</i> peptidases.....	121
Table 2: Peptidases found in the band demarcated in the zymogram and identified by mass spectrometry.....	126
Table 3. Coupling affinity energy, interaction type and geometric distance (Å) for TvMP50 with ligands.....	134
Table 4. Coupling affinity energy, interaction type and geometric distance (Å) for TvGP63 with ligands.....	134

Capítulo IV

Table 1: Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Bactericidal or Fungicidal Concentrations (MBC or MFC) of Cu-phendione (µg/mL) for in vitro antibacterial and antifungal activity.....	148
--	-----

Capítulo V

Tabela 1: Caracterização físico-química de nanocápsulas brancas (NC) e com cobre-fendiona (NC-CPh) por 28 dias.....	163
--	-----

Sumário

INTRODUÇÃO.....	19
REVISÃO DO TEMA	23
Microambiente vaginal	25
Vaginite aeróbica	27
Candidíase vulvovaginal	27
Tricomoniase.....	28
<i>Trichomonas vaginalis</i>	31
Morte celular.....	33
Metabolismo oxidativo	34
Peptidases	37
Tratamento.....	41
1,10-fenantrolina-5,6-diona e derivados metálicos	42
Nanotecnologia aplicada à via vaginal.....	45
OBJETIVOS.....	49
Objetivo Geral	51
Objetivos específicos:.....	51
CAPÍTULO I: Rigo, Graziela Vargas; Frank, Luiza Abrahão; Galego, Giulia Bongiorno; Santos, André Luis Souza; Tasca, Tiana. Novel Treatment Approaches to Combat Trichomoniasis, a Neglected and Sexually Transmitted Infection Caused by <i>Trichomonas vaginalis</i>: Translational Perspectives. Venereology.....	53
CAPÍTULO II: Graziela Vargas Rigo, Júlia Biz Willig, Michael Devereux, Malachy McCann, André Luis Souza dos Santos, Tiana Tasca. Oxidative damage by 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its silver and copper complexes lead to apoptotic-like death in <i>Trichomonas vaginalis</i>. Manuscrito será submetido para <i>International Journal of Antimicrobial Agents</i>.....	89
CAPÍTULO III: Graziela V. Rigo, Fernanda Cardoso, Matheus Mendonça Pereira, Michael Devereux, Malachy McCann, André Luis Souza dos Santos, Tiana Tasca. <i>In vitro</i> evaluation and docking of copper-phendione against peptidases of <i>Trichomonas vaginalis</i>. Manuscrito será submetido para <i>The International Journal of Biochemistry & Cell Biology</i>	113
CAPÍTULO IV: Graziela V. Rigo, Fernanda Cardoso, Alexandre José Macedo, Michael Devereux, Malachy McCann, André Luis Souza dos Santos, Tiana Tasca. Antimicrobial and antibiofilm activity of copper-phendione on commensal bacterial and fungal strains responsible for dysbiosis on vaginal microbiota. Manuscrito será submetido para <i>Microbes and Infection</i>	141
CAPÍTULO V: Resultados preliminares do desenvolvimento de formulação intravaginal com nanocápsulas poliméricas contendo cobre-fendiona, realizado em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Silvia Stanisçuaski Guterres, do Grupo de Sistemas	

Nanoestruturados para Administração de Fármacos, Faculdade de Farmácia, UFRGS	155
DISCUSSÃO GERAL	175
CONCLUSÕES	189
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	197
ANEXOS	215
.....	216
Anexo 1: Vaginitis: Review on Drug Resistance	217
.....	232
Anexo 2: Autorização para uso de imagem como figura 2 da seção Estado da Arte.	233
Anexo 3: Lista de artigos publicados na vigência do doutorado	235

INTRODUÇÃO

A microbiota vaginal saudável é representada pela colonização de *Lactobacillus* spp., compondo o estado de eubiose, e sua escassez representa risco para desenvolvimento de infecção por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis* (VALENTI *et al.* 2018). Além disso, a microbiota pode apresentar outros microrganismos em menor quantidade, como espécies pertencentes aos gêneros de *Gardnerella*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Ureaplasma*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Mycoplasma*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* e *Candida*.

O patógeno *T. vaginalis* é o agente responsável pela tricomoníase, infecção sexualmente transmissível (IST) de origem não viral mais comum no mundo. Embora 80% dos casos ocorram de forma silenciosa e assintomática, infecções sintomáticas crônicas nas regiões vulvar e uretral do trato genital também são relatadas (MENEZES *et al.* 2016). Quando crônica, a IST pode levar a sérias complicações como doença inflamatória pélvica, câncer cervical e de próstata (SUTCLIFFE, 2010; GHOSH *et al.*, 2016; WIRINGA *et al.*, 2020), parto prematuro e baixo peso de recém-nascidos (VAN GERWEN *et al.*, 2021). A última estimativa global da tricomoníase foi realizada em 2016, onde apresentou incidência de 156 milhões de novos casos e uma prevalência de 110 milhões de adultos infectados, entre 15 e 49 anos (ROWLEY *et al.*, 2019). A relação bidirecional da infecção com a transmissão e aquisição de HIV/AIDS é estabelecida e o controle da tricomoníase pode representar um meio de manejo do risco de transmissão do vírus (MAVEDZENGE *et al.* 2010). De acordo com Food and Drug Administration (FDA, EUA), os únicos fármacos aprovados para o tratamento oral da tricomoníase são da classe dos 5-nitroimidazóis, metronidazol (MTZ), secnidazol e tinidazol (TNZ), apresentando semelhante mecanismo de ação. Além disso, efeitos adversos envolvendo náuseas, vômitos, cefaleia, insônia, vertigem e sonolência são descritos durante o tratamento (MENEZES *et al.* 2016). Falhas terapêuticas incluem a resistência dos isolados de *T. vaginalis* aos fármacos 5-nitroimidazóis (DUNNE *et al.* 2003, SCHWEBKE *et al.*, 2006; BAHADORY *et al.*, 2021). Até o momento, uma única dose oral de MTZ continua sendo o tratamento recomendado e mais clinicamente eficaz, no entanto, as taxas de infecção recorrente em mulheres são de 5 a 30%, mas também chegam a 37% nas populações de indivíduos infectados pelo HIV (HOWE *et al.*, 2017).

Derivados de fenantreno, como a molécula 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona) ligada ou não a metais como cobre (Cu^{2+}) e prata (Ag^+) são alvos de investigação antimicrobiana, com ação inibitória descrita sobre proteases (SUBHAN *et al.* 2014; TAY

et al. 2015; VIGANOR *et al.* 2016; GRANATO *et al.* 2017, LIMA *et al.*, 2021). O perfil de toxicidade destes compostos já foi avaliado no modelo alternativo *in vivo* de larvas de *Galleria mellonella* e em camundongos, apresentando melhor tolerância que o agente antitumoral cisplatina utilizada na clínica (MCCANN *et al.* 2012). Na investigação da ação anti-*T. vaginalis*, a potente e seletiva atividade tricomonocida dos compostos foi descrita com valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração necessária para matar 50% dos trofozoítos (IC₅₀) obtidos para o complexo [Cu (fendiona)₃]²⁺ (IC₅₀ = 0,87 μM e CIM = 8,84 μM) mais potentes do que os resultados obtidos para MTZ (IC₅₀ = 1,64 μM e CIM = 9,71). O efeito sinérgico entre cobre-fendiona e MTZ foi evidenciado em concentração reduzida frente ao isolado menos sensível ao MTZ (RIGO *et al.*, 2018).

A busca de novos tratamentos para tricomoníase e infecções da via vaginal segue despertando o interesse dos pesquisadores, em especial formulações de aplicação tópica. Grande superfície de contato, boa permeabilidade a muitos fármacos, elevada irrigação sanguínea e relativa facilidade de administração do fármaco são algumas das principais características para utilização da via vaginal (BALOGLU *et al.* 2009; PANDEY *et al.*, 2020; NEVES *et al.*, 2021). Embora o local também possa apresentar desvantagens, como a redução do tempo de permanência de fármacos na região devido presença de descarga vaginal, estratégias que aumentem a adesão de formulações na mucosa possibilitam um maior tempo em contato. Além disso, deve-se atentar à necessidade de uma baixa propensão para causar irritação genital e toxicidade sistêmica (VALENTA 2005, VANIC *et al.* 2013). Considerando a alta seletividade do complexo cobre-fendiona frente a diferentes isolados de *T. vaginalis* e baixa citotoxicidade frente a fibroblastos e eritrócitos, torna-se atrativo para incorporação em nanocápsulas poliméricas para aplicação vaginal (RIGO *et al.*, 2018). Sistemas nanoestruturados são vantajosos por protegerem o ativo da degradação e possibilitar uma liberação controlada, aumentando o tempo de contato com a mucosa (FRANK *et al.* 2014; CARAMELLA *et al.* 2015; FRANK *et al.* 2017). Sendo assim, estratégias como a incorporação de compostos em nanocápsulas poliméricas e sua posterior incorporação em polímeros mucoadesivos representam uma nova alternativa de tratamento para possíveis enfermidades que acometem a mucosa vaginal, como é o caso da tricomoníase.

REVISÃO DO TEMA

Microambiente vaginal

O ambiente vaginal depende do equilíbrio entre bactérias não patogênicas e produtos metabólicos provenientes do hospedeiro e de microrganismos, como proteínas e peptídeos secretados em meio a células epiteliais e células imunes. Neste microambiente, encontram-se bactérias anaeróbicas facultativas, como espécies de *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. casei*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. iners*), estreptococos não hemolítico, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* e bactérias anaeróbicas obrigatórias, como *Eubacterium* spp., *Corynebacterium* spp. e *Veillonella* spp. (MILLS, 2017). Diversos efeitos protetores decorrentes da presença de *Lactobacillus* spp. no trato vaginal já foram descritos, como: competição por nutrientes e adesão ao epitélio vaginal com outros microrganismos; diminuição do pH vaginal pela degradação do glicogênio liberado pelas células vaginais com produção de ácidos orgânicos, exercendo atividade antimicrobiana seletiva contra a microbiota não residente; produção de bacteriocinas e peróxido de hidrogênio com atividade antimicrobiana e modulação do sistema imunológico local (VENNERI *et al.*, 2022).

Vaginite é caracterizada pelo desequilíbrio no microambiente vaginal, resultado da diminuição da microbiota anfibiônica composta por *Lactobacillus* spp. O resultado desta alteração de equilíbrio é denominado disbiose, um conjunto de manifestações clínicas vaginais e/ou vulvares como corrimento vaginal, prurido, queimação e odor (HAINER e GIBSON, 2011; GOJE e MUNOZ, 2017). A homeostase da microbiota vaginal está sob alta pressão devido a hábitos que levam à desestabilização de comunidades bacterianas, como demonstrado pelo uso de espermicidas e antimicrobianos, hábitos sexuais e de controle de natalidade, produtos de ducha vaginal capazes de inibir o crescimento de espécies de *Lactobacillus*, relações sexuais frequentes, múltiplos parceiros e gravidez. Além disso, fatores fisiológicos atribuídos à maturação reprodutiva podem perturbar comunidades bacterianas, como idade, alterações hormonais e ciclo menstrual (HICKEY *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2014; NOYES *et al.*, 2018). Uma vez comprometido o fator de proteção realizado pela microbiota vaginal, este microambiente pode ser colonizado por outros organismos adquiridos por transmissão sexual e hábitos precários de higiene ou possibilitar o desenvolvimento de espécies oportunistas.

Vulvovaginite (VV) refere-se a queixas vulvares e vaginais atribuídas a várias causas. As infecções mais frequentes relacionadas à VV são: tricomoníase causada pelo

protozoário *Trichomonas vaginalis*; vaginose bacteriana (VB) causada por bactérias anaeróbicas, incluindo *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp., *Mobiluncus* spp., *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma* spp., ou anaeróbios fastidiosos e candidíase vulvovaginal (CVV) derivada do crescimento excessivo de espécies de *Candida*. Ainda, vaginite aeróbia (VA) é uma infecção oportunista endógena provocada pela ruptura da microbiota vaginal normal, caracterizada pela presença de estreptococos beta hemolíticos, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* (KAAMBO *et al.*, 2018). Além disso, causas não infecciosas de VV também são descritas, como resultado de vaginite inflamatória descamativa, úlceras aftosas, vaginite atrófica, doença de Behçet, neoplasias e outros (GOJE e MUNOZ, 2017; WORKOWSKI *et al.*, 2021). Na revisão de Hainer e Gibson (2011), diversos fatores de risco para o progresso da VV foram descritos, incluindo baixo status socioeconômico, numerosos parceiros sexuais e relações sexuais desprotegidas, comumente relacionadas à VB e tricomoníase, bem como o uso de antimicrobianos e diabetes *mellitus* não controlada estão relacionados com CVV. Esses patógenos são identificados por métodos de diagnóstico baseados na descrição dos sintomas e na identificação etiológica de microrganismos, como o teste de hidróxido de potássio - especialmente para a visualização da presença de *Candida* spp.-, avaliação de pH e exame microscópico do corrimento vaginal a fresco (HAINER e GIBSON, 2011). Coloração de Gram para *G. vaginalis*, técnicas de cultura de leveduras para *Candida* spp. e amplificação de ácidos nucleicos para *T. vaginalis* são consideradas os padrões-ouro para diagnóstico laboratorial de VV (WORKOWSKI *et al.*, 2021).

Diagnóstico precoce e tratamento eficiente são essenciais para a manutenção da saúde da paciente. Além do desconforto local e distúrbios ginecológicos, essas infecções podem desenvolver várias complicações, como aumento da suscetibilidade ao HIV. Anormalidades da microbiota vaginal causadas por infecções sexualmente transmissíveis (IST), bem como alguns mecanismos moleculares que permitem a aquisição de vírus, foram associados à infecção pelo HIV (ATASHILI *et al.*, 2008; MOODLEY *et al.*, 2002). A relação positiva da tricomoníase com a transmissão e aquisição do HIV apresentam mecanismos que corroboram com a transmissão potencial do vírus: dano ao epitélio do hospedeiro, recrutamento de linfócitos TCD4⁺ para o local da infecção, secreção de cisteína-peptidases que realizam a clivagem da proteína inibidora de protease secretada por leucócitos, além da elevada carga viral nos compartimentos seminal/cervicovaginal (KISSINGER e ADAMSKI, 2013; MASHA *et al.*, 2019).

Vaginite aeróbica

Infecções causadas por bactérias responsáveis por vaginite aeróbica também geram resultados inesperados na gravidez e causam preocupações em relação à saúde da mulher. A infecção é relatada em 8-11% das mulheres grávidas e em 5-24% das mulheres que relataram queixas vaginais (ZARBO *et al.*, 2013). Descrita pela primeira vez em 2002, a infecção denominada de vaginite aeróbica apresenta sinais clínicos importantes, tais como pH maior de 4,5 (frequentemente maior que 6), corrimento amarelado, presença de inflamação epitelial, visualização de células parabasais e teste de Whiff ou teste das aminas negativo. Além disso, é observada alta quantidade de citocinas inflamatórias (DONDERS *et al.*, 2015). Esta condição também é marcada pela diminuição de espécies de *Lactobacillus* e pela presença de patógenos comensais ou entéricos principalmente aeróbicos, incluindo *Streptococcus* do Grupo B (*S. agalactiae*), *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *S. aureus* (KAAMBO *et al.*, 2018).

A presença de *S. agalactiae* apresenta elevado risco para mulheres grávidas, sendo principal fator de risco para doença invasiva de início precoce em recém-nascidos e eventualmente pode causar infecções em idosos, gestantes e pacientes com condições predisponentes subjacentes (BRIGTSEN *et al.*, 2015). Além disso, a colonização por *S. agalactiae* em gestantes no momento do parto está associada à sepse neonatal, meningite e pneumonia (KRAUSS-SILVA *et al.*, 2014).

Candidíase vulvovaginal

A presença de espécies de *Candida* na mucosa vaginal pode ser considerada como comensal quiescente, sem sintomas e sinais; no entanto, o crescimento excessivo dessas espécies em locais genitais pode levar à inflamação e candidíase vulvovaginal (CVV) sintomática (SOBEL *et al.*, 1998). As Diretrizes de Tratamento para IST do CDC estimaram que 75% das mulheres apresentarão um episódio de CVV na vida e 45% terão dois ou mais episódios com sintomas clássicos como prurido na vulva e na vagina, corrimento vaginal anormal, dor vaginal e dispareunia (SOBEL, 1992; WORKOWSKI *et al.*, 2021). De acordo com as características da infecção, a CVV pode ser classificada pela presença ou ausência de complicações. Em um caso simples, a CVV ocorre em mulheres imunocompetentes com sintomas leves a moderados esporadicamente, sendo *Candida albicans* o principal patógeno. No entanto, a CVV complicada segue com frequência recorrente, sintomas graves ocorrem em mulheres com condições predisponentes e pode

ser observada candidíase causada por espécies de *Candida* não-*albicans* (SOBEL *et al.*, 1998; WORKOWSKI *et al.*, 2021). Questões comportamentais e fisiológicas podem atuar como fatores predisponentes, permitindo o crescimento desordenado e o estabelecimento de espécies de *Candida*, como observado em mulheres com histórico de clamídia, diabetes, uso de antibióticos, estresse crônico, capacidade antioxidante geral diminuída, contato genital oral e uso de contraceptivos orais de primeira geração contendo alto estrogênio (SOBEL *et al.*, 1998; LEON *et al.*, 2002; AKIMOTO-GUNTHER *et al.*, 2016).

Quando os episódios sintomáticos ocorrem três ou quatro vezes em um ano, pode ser definido como CVV recorrente (RVVC), uma causa significativa de morbidade que afeta 138 milhões de mulheres anualmente, com uma prevalência anual global de 3871 por 100.000 mulheres (SOBEL, 2016; DENNING *et al.*, 2018). Uma pesquisa recente com 284 mulheres não grávidas com histórico de CVV mostra uma frequência anual de RVVC de 18,6% entre 18 e 25 anos, 44,3% na faixa de 26 a 40 anos, 24,3% na faixa de 41 a 55 anos e 12,9% em mulheres com mais de 55 anos. Na população mais afetada (26 a 40 anos), está principalmente associada a fatores predisponentes hormonais e comportamentais para a infecção, enquanto na idade perimenopausal e pós-menopáusia (41 a 55 anos e 56 anos ou mais) pode ocorrer devido ao aumento do uso de estrogênio exógeno e condições de saúde relacionadas (YANO *et al.*, 2019).

Mulheres saudáveis apresentam colonização assintomática que pode durar meses a anos, onde o patógeno comensal sobrevive em harmonia com a microbiota no trato genital. A ocorrência de fatores predisponentes aumenta a proliferação de espécies, diminui as defesas naturais do hospedeiro e ativa o sistema imunológico inato, que fornece a primeira barreira contra infecções vulvovaginais por *Candida* (SOBEL, 2016). Várias espécies de *Candida* foram listadas como agentes causadores de VVC e RVVC, sendo *Candida albicans* a mais predominante, seguida por espécies não albicans, como *C glabrata*, *C tropicalis*, *C krusei* e *C parapsilosis* (FARR *et al.*, 2021)

Tricomoniase

A tricomoníase é uma IST causada pelo patógeno *T. vaginalis*. A estimativa global da infecção mais recente ocorreu no ano de 2016 onde foi encontrada uma incidência de aproximadamente 156 milhões de novos casos e uma prevalência de 110 milhões de adultos infectados, entre 15 e 49 anos (ROWLEY *et al.*, 2019). O levantamento mais recente foi realizado nos Estados Unidos utilizando dados de 2018 que demonstrou uma

incidência de 6,9 milhões de pessoas infectadas, sendo 3,3 e 3,5 milhões de homens e mulheres, respectivamente. Em termos de prevalência é possível observar um maior acometimento entre mulheres, responsáveis por 2,1 milhões de casos de um total de 2,6 milhões (KREISEL *et al.*, 2021). No estado do Rio Grande do Sul, foi encontrada uma taxa de 9% de infecção entre mulheres e a frequência maior foi observada na faixa etária de 18 a 39 anos (AMBROZIO *et al.*, 2016). Outro estudo, 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 e as informações com relação à estimativa de duração da infecção são limitadas. Os métodos de diagnóstico laboratorial mais baratos e rápidos apresentam baixa sensibilidade (44–68% comparado ao cultivo) e, além disso, há evidências de casos assintomáticos não diagnosticados em ambos os sexos (VAN GERWEN *et al.*, 2019). Testes de amplificação de ácidos nucleicos são considerados padrão ouro para detecção de tricomoníase e a investigação deve ser realizada caso ocorra corrimento vaginal ou avaliação anual em mulheres com maior risco de infecção. Casos positivos devem ser tratados e testados novamente após 3 meses (WORKOWSKI *et al.* 2021). A prevalência mundial da tricomoníase é muito maior quando comparada a outras ISTs curáveis, como gonorreia e sífilis, ambas somando 50,5 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 (VAN GERWEN *et al.*, 2019; ROWLEY *et al.*, 2019).

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. Os homens geralmente são assintomáticos e considerados carreadores de *T. vaginalis*, porém casos sintomáticos surgem com a presença de uretrite, epididimite ou prostatite (WORKOWSKI *et al.* 2021). A secreção prostática apresenta concentração de zinco que pode variar normalmente em uma faixa de 2,3 -15,3 mM, conferindo proteção frente ao parasito, impedindo sua adesão às células e eliminando a tricomoníase (KRIEGER *et al.*, 1982). No entanto, o parasito pode ser

encontrado na glândula prostática causando inflamação aguda não específica (MITTEREGGER *et al.*, 2012).

Atualmente 80% dos casos de tricomoníase são assintomáticos, o que torna mais fácil a disseminação e configura uma doença silenciosa e de curso crônico (POOLE & MCCLELLAND, 2013), levando a complicações como doença inflamatória pélvica, câncer cervical e de próstata (WIRINGA *et al.*, 2020; GHOSH *et al.*, 2016; SUTCLIFFE, 2010). Parto prematuro, ruptura das membranas fetais antes do início das contrações uterinas e baixo peso de bebês são os principais resultados adversos relacionados à infecção por *T. vaginalis* durante a gravidez (VAN GERWEN, *et al.*, 2021). Muito importante, e já bastante estabelecida, é a associação da tricomoníase com o aumento da transmissão do HIV (SORVILLO *et al.*, 2001; MCCLELLAND *et al.*, 2007; MASHA *et al.*, 2019). Recentemente, foi demonstrada que indivíduos infectados com *T. vaginalis* apresentam uma a probabilidade maior de aquisição de HIV em 50% (MASHA *et al.*, 2019). Ainda, foi descrita a relação bidirecional entre as duas infecções, 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 de manejo do risco de transmissão do HIV mundialmente.

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 16.590 novos casos em 2020, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil (INCA, 2021). Estudo realizado com mais de 310 mil mulheres na China encontrou uma relação positiva entre a coinfeção de *T. vaginalis* e papiloma vírus humano (HPV) (YANG *et al.*, 2020). Foi descrito que a infecção por HPV estaria correlacionada ao microambiente do colo do útero e, considerando a reação inflamatória causada pela presença de *T. vaginalis* no local, a ativação contínua de fatores de transcrição inflamatórios leva a danos no tecido cervical e aumenta a suscetibilidade e a capacidade carcinogênica do HPV16 (HUANG *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2020). Um estudo realizado no Brasil corrobora com os achados relacionados à associação entre tricomoníase e HPV, onde 73,8% das mulheres infectadas com *T. vaginalis* apresentava coinfeção com HPV (BELFORT *et al.*, 2021). Câncer de próstata apresenta-se como o segundo mais comum entre os homens, com estimativa de 65.840 casos em 2020 que correspondem a 29,2% dos tumores incidentes no sexo masculino,

segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2021). 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 *et al.*, 2010).

Trichomonas vaginalis

T. vaginalis é um protozoário extracelular flagelado que pertence à família Trichomonadidae, à ordem Trichomonadida, à classe Parabasalia e ao filo Zoomastigina. O primeiro relato foi realizado em 1836 pelo médico europeu Alfred Donné em amostra de secreção vaginal humana (SCHWEBKE e BURGESS, 2004).

O polimorfismo atribuído ao *T. vaginalis* decorre da sua capacidade de alterar a morfologia, adequando à sua necessidade de sobrevivência. Assim como os demais tricomonádídeos, 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 células epiteliais vaginais (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, como deficiência nutricional em crescimento prolongado, tratamento com água clorada e baixo pH (BENCHIMOL, 2004; BERI *et al.*, 2020).

T. vaginalis 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 (Figura 1). 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 outros eucariotos, os tricomonádídeos 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).

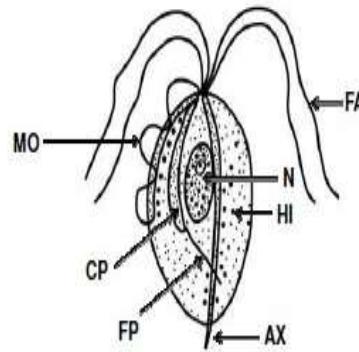


Figura 1: Características morfológicas de *T. vaginalis*. MO: membrana ondulante, CP: corpo parabasal, FP: filamento parabasal, AX: axóstilo, HI: hidrogenossomo, N: núcleo, FA: flagelos anteriores livres. Adaptado: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Trichomoniasis.htm>.

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. 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 à 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.

Morte celular

A morte celular em organismos que possuem mitocôndria pode ocorrer através de necrose ou morte celular programada (do inglês, *programmed cell death*- PCD). Na necrose é observada a forma passiva e descontrolada de morte celular, enquanto na PCD ocorre um processo altamente regulado e com vias bem definidas. A PCD é classificada 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; TAIT *et al.*, 2014). 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 (*Nomenclature Committee on Cell Death*, NCCD) já foram descritas diferentes formas de morte celular programada, 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).

Os eventos de diferenciação permitem a adaptação e o estabelecimento dos parasitos nos sítios de infecção, indicando que a morte celular regulada atua limitando a proliferação, virulência e patogenicidade além de promover a transmissão. A morte por estresse induzido é alvo da pesquisa de muitos agentes antiparasitários, através da avaliação morfológica e bioquímica do protozoário (PROTO *et al.*, 2013).

Tricomonádídeos 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).

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, compete 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 são efetivos, ocorrerá desequilíbrio entre a produção e remoção de espécies reativas de oxigênio (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•), e são danosos a componentes celulares, como enzimas, DNA, lipídios de membrana e outros (DROGE, 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.

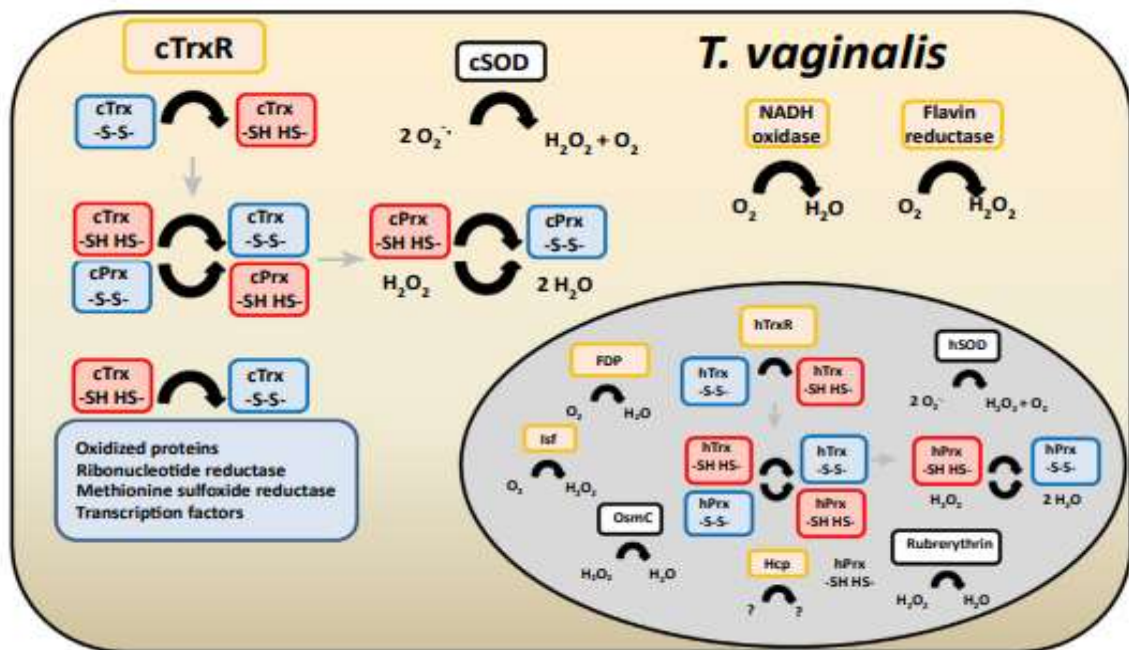


Figura 2: Vias redox no parasito microaerofílico *T. vaginalis*, sendo o citoplasma representado na parte rosa e o hidrogenossomo em cinza clara. TRX, tioredoxina redutase; PRX, peroxirredoxina; SOD, superóxido dismutase; FDP, proteínas flavodiiron; Isf, flavoproteína contendo ferro-enxofre; OsmC, proteína osmoticamente induzível. Imagem adaptada de Leitsch *et al.*, 2018 (número de autorização para uso: 5146121477417, 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 como acceptor de elétrons, reduzindo O₂ e gerando uma molécula de H₂O (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 O₂ na presença do cofator mononucleotídeo de flavina (FMN); no entanto, apresenta H₂O₂ 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 (O²⁻). 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 O₂ e H₂O₂ (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 O₂ 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 O₂ em água. Essa proteína está localizada nos hidrogenossomos e apresenta oxigênio, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e antimicrobianos de largo espectro, como MTZ e cloranfenicol, como aceptores de elétrons (SMUTNÁ *et al.*, 2014).

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) está entre as EROs que causam maior dano a microrganismos. Atuando como um oxidante mais reativo que o O₂, 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 (Fe²⁺), formado pela redução de Fe³⁺ e grupamentos tióis. Altas quantidades de Fe²⁺

no organismo microaerofílico levam à formação de radicais hidroxila (OH⁻), capazes de reagir com proteínas, membranas e ácidos nucleicos. A principal enzima da degradação do H₂O₂ é a catalase; no entanto, como está ausente em *T. vaginalis*, é substituída por peroxirredoxinas através de um mecanismo dependente de cisteinil, onde há redução da molécula reativa para H₂O (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-nitroimidazois, 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, uma nova classe de enzimas foi descri

capazes de converter H₂O₂ em uma forma menos danosa à célula, denominada de rubreritrina; 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).

Peptidases

Entre as moléculas produzidas e secretadas pelo parasito, destaca-se a presença das peptidases, também conhecidas como protease. Este grupo de enzimas caracteriza-se pela clivagem proteolítica, ou seja, a quebra de ligações peptídicas entre os aminoácidos presentes em peptídeos e proteínas, podendo ser classificadas 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.*, *T. vaginalis* apresenta cerca de 440 genes codificadores de peptidases 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).

Cisteína-peptidases

Em 1983 um estudo evidenciou a presença de cisteína-peptidases (CPs) pela elevada atividade de enzimas proteolíticas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (COOMBS e NORTH, 1983). Descrita em outros parasitos, como *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Entamoeba histolytica*, *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*, essa classe de moléculas vem despertando o interesse pelas inúmeras funções as quais se relacionam, sendo caracterizadas a nível molecular e celular (HERNÁNDEZ et al. 2014). Em *T. vaginalis*, CPs são as principais enzimas proteolíticas expressas e podem ser classificadas em duas principais famílias: C1 (catepsina L-like) e C13 (legumain-like). A família de peptidases do tipo catepsina apresentam sítios catalíticos altamente conservados e formados por três resíduos, denominados “tríade catalítica”: cisteína (Cys25), histidina (His159) e asparagina (Asn175). Até o momento, nove peptidases relacionadas à C1 já foram caracterizadas: TvCP1, TvCP2, TvCP3, TvCP4, TvCP4-like, TvCP12, TvCP25, TvCP39 (TvCPT) e TvCP65. Entre os membros da família C13, apenas TvLEGU-1 e TvLEGU-2 foram descritos neste parasito e ambos apresentam um peptídeo sinal e um propeptídeo localizado no terminal C do domínio catalítico (ARROYO et al., 2015). 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 (ARROYO et al., 2015). A presença da glicose também demonstrou modular aspectos relacionados com a virulência. Considerada fonte primária de carbono para *T. vaginalis*, sob condições anaeróbicas e aeróbicas, glicose é vital para geração de energia e a manutenção da infecção crônica. A restrição desse nutriente aumentou a atividade proteolítica de CP, como TvCP2, desempenhando um papel importante na indução de apoptose durante o dano celular (MIRANDA-OZUNA et al., 2019). Essas enzimas podem ser encontradas em diferentes compartimentos celulares, como lisossomo e membrana plasmática, ou ainda liberada 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 celular (HUANG et al., 2012). De fato, estudos recentes utilizando análise proteômica do lisossomo do protozoário demonstrou a secreção lisossomal de CP, como TvCP2, contribuindo para a citotoxicidade da célula hospedeira (ZIMMANN et al., 2022).

Além de degradar o muco, essas peptidases são liberadas no sítio de infecção, contribuindo para a descamação do tecido epitelial cervical e vaginal e, assim permitindo o acesso aos componentes da membrana basal do hospedeiro. Uma vez que CPs podem interagir com moléculas importantes no sítio de ligação, como fibronectina, actina e enolase, sua função no processo de citoaderência é bem elucidada como, por exemplo, TvLEGU-1, CP30 e CP62 (ARROYO *et al.*, 2015, HERNÁNDEZ *et al.* 2014). Estudos já evidenciaram a participação da CP30 neste processo, além de ser amplamente detectada em lavagens vaginais de mulheres que apresentam tricomoníase sintomática e em 80% das lavagens de infecções assintomáticas (YADAV *et al.*, 2007). A ação citotóxica dessa classe de moléculas já foi descrita pelo prejuízo causado às células do hospedeiro através do dano à membrana plasmática, como observado para CP12, CP65 e CP39. Da mesma forma, um aumento nas CPs secretadas (TVCP2, TVCP3, TVCP4 e TVCPT) também foi relacionado a sua capacidade de induzir a morte celular programada do epitélio vaginal humano (KUMMER *et al.* 2008). O parasito apresenta diferentes mecanismos a fim de obter os nutrientes necessários para sua sobrevivência, desta forma, há peptidases aprimoradas para a obtenção de ferro através da lise de células vermelhas da corrente sanguínea, como uma CP de 60-kDa identificada pela sua capacidade de lisar a hemoglobina presente na infecção (MIN *et al.*, 1998). Esta classe ainda é descrita pelo papel desempenhado durante a evasão do sistema imunológico, pois são capazes de degradar componentes importante do sistema imunológico humoral, como a porção C3 do complemento além de atuar contra anticorpos IgG, IgM e IgA produzidos pela mucosa. Entre as defesas do hospedeiro, encontra-se o inibidor de proteases leucocitárias secretadas (SLPI) que é capaz de prevenir infecção pelo HIV, no entanto já é descrito que peptidases provenientes do metabolismo do parasito são capazes de degradar SLPI e torná-lo não funcional (AL-MOHAMMED e HUSSEIN, 2006; HUPPERT *et al.*, 2013).

Serina peptidases

Serina peptidases são amplamente distribuídas pela natureza, encontradas em diversos reinos animais e descritas em diferentes microrganismos. A propriedade nucleofílica do resíduo catalítico de serina (Ser) é dependente de uma tríade catalítica de resíduos, denominada de sistema de revezamento de carga, composta por aspartato (Asp), histidina (His) e Ser. Essa tríade pode ser observada em pelo menos quatro conformações proteicas distintas, como o caso da tripsina, subtilisina, propil-oligopeptidases e peptidases ClpP, utilizadas para catalisar a hidrólise da ligação peptídica (DI CERA, 2009). Serina

peptidases desempenham papel decisivo na infecção de parasitos do grupo apicomplexa, como *Plasmodium falciparum*, *Cryptosporidium parvum* e *Toxoplasma gondii* (CONSEIL *et al.*, 1999). Além disso, a participação dessas enzimas em helmintos já foi relacionada ao desenvolvimento e nutrição dos parasitos, invasão às células do hospedeiro, anticoagulação e evasão do sistema imune em nematoides (*Trichinella spiralis*, *T. pseudospiralis*, *Trichuris muris*, *Anisakis simplex*, *Ascaris suum*, *Onchocerca volvulus*, *O. lienalis*, *Brugia malayi*, *Ancylostoma caninum* e *Steinernema carpocapsae*), cestoides (*Spirometra mansoni*, *Echinococcus granulosus* e *Schistocephalus solidus*) e trematódeos (*Fasciola hepatica*, *F. gigantica* e *Schistosoma mansoni*) (YANG *et al.*, 2015). Em *T. vaginalis* já foram descritas 33 serina-peptidases do tipo subtilisina, com suas sequências depositadas no banco de dados do genoma, sendo que seis apresentam domínio extracelular ligado a membrana, em sua maioria há um domínio transmembranaral que ancora proteínas e apenas duas têm um peptídeo sinal previsto para o tráfico intracelular (HERNÁNDEZ-ROMANO *et al.*, 2010). Atualmente, mais duas serinapeptidases 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

Metalopeptidases (MPs) pertencem a um grupo diverso de enzimas, possuindo representantes como endo e exopeptidases. Quando a proteína está em sua forma intacta, ativa e ligada ao metal é descrita como "enzima" ou a "holoenzima". Se a enzima tiver um ligante ligado, ela pode ser descrita como um complexo enzima-ligante. A enzima que carece de um íon metálico indispensável para a catálise é descrita como "apoenzima". Os resíduos ligantes de metais são principalmente histidinas, aspartatos e glutamatos e sua reação ocorre em um único passo, envolvendo uma molécula de solvente e um sítio metálico catalítico mono- ou dinuclear (CERDÀ-COSTA e GOMIS-RÜTH, 2014). Em *T. vaginalis* já foi caracterizada a presença de diversas MPs diretamente envolvidas na patogênese da infecção como também presente nos produtos de excreção e secreção do parasito, induzindo respostas nas células hospedeiras. Atualmente, descobriu-se a presença de uma MP homodimérica de processamento hidrogenossomal (BROWN *et al.*, 2007). A MP GP63 são os principais agentes patogênicos de *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, e desempenham um papel importante nas interações parasito-hospedeiro. Em *T. vaginalis*, TvGP63 é uma família de enzimas que apresenta 48 membros

sendo 37 proteínas transmembranas e sua atividade foi relacionada com citotoxicidade às monocamadas de células HeLa (MA *et al.*, 2011; QUAN *et al.*, 2014). Recentemente foi descrita a presença da TvMP50, uma MP imunogênica detectada durante a tricomoníase em amostra de soro de pacientes 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; ARREOLA *et al.*, 2018).

Aspartato peptidase

Aspartato peptidases (AP) referem-se a enzimas proteolíticas que apresentam dois resíduos de ácido aspártico em seu sítio catalítico e são bem caracterizadas em vertebrados, fungos e vírus. Entre os genes de peptidases codificados por *T. vaginalis*, seis deles são classificados como APs, sendo: uma pepsina-like da subfamília semelhante à catepsina, uma subfamília semelhante à retropepsina, e quatro pré-amigdalina como membros (CARLTON *et al.*, 2007). Mancilla-Olea descreve a presença de uma aspartato peptidase do tipo catepsina-D (Tv-CatD) de múltiplas localizações (lisossomal, no complexo de golgi, retículo endoplasmático e núcleo) e está envolvida na hemólise por degradar a hemoglobina já descrita em outros parasitos por ações como degradação de hemoglobina, proteínas séricas e macromoléculas do hospedeiro (MANCILLA-OLEA *et al.*, 2018).

Tratamento

No tratamento da tricomoníase, os únicos fármacos recomendados pelo Food and Drug Administration (FDA, EUA) são o metronidazol (MTZ), secnidazol e tinidazol (TNZ). Ambos pertencem à classe dos 5-nitroimidazois, com idêntico mecanismo de ação, e apresentam uma série de efeitos adversos que incluem náuseas, vômitos, cefaleia, insônia, vertigem e sonolência (MENEZES *et al.* 2016). 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 enzima piruvato:ferredoxina oxidoreductase (PFOR) e encaminhandos 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).

A primeira descrição de falha terapêutica do MTZ na tricomoníase foi relatada em 1962, apenas três anos após a introdução do MTZ para o tratamento desta infecção (ROBINSON, 1962). Assim, apesar de a tricomoníase ser considerada uma IST curável, as falhas terapêuticas incluem a resistência dos isolados de *T. vaginalis* aos fármacos 5-nitroimidazois em uma taxa de 10% (DUNNE et al. 2003, SCHWEBKE 2006). Esses valores, quando comparados à prevalência e incidência, geram preocupantes números de 160.000 pessoas nos EUA e aproximadamente 10 milhões no mundo necessitando tratamento alternativo (SECOR et al. 2014).

O anexo 1 desta tese apresenta um artigo de revisão publicado por Rigo e Tasca (2020) que demonstra as diferentes vias de resistência descritas para os principais agentes causadores de vaginite infecciosa. Em *T. vaginalis* destaca-se vias hidrogenossomais, capacidade de detoxificação, disponibilidade de ferro, presença de simbioses, presença de fragmento de espaçador transcrito interno e polimorfismos de nucleotídeo único como principais vias responsáveis pela redução da efetividade do tratamento com MTZ (RIGO e TASCA, 2020). Além disso, a avaliação do estudo translacional da tricomoníase, ou seja, trajeto percorrido entre produção do conhecimento nos laboratórios e a aplicação prática na medicina, está demonstrado no capítulo I desta tese (RIGO et al., 2022). Observa-se que, nos últimos 10 anos, apenas o secnidazol atravessou todas as etapas de desenvolvimento, envolvendo testes *in vitro* e clínicos, sendo aprovado pelo FDA para tratamento da tricomoníase. Considerando o longo período para aprovação de novos tratamentos, bem como as diferentes vias de resistência descritas em *T. vaginalis*, é urgente a prospecção de moléculas com atividade tricomonocida que atuem por diferentes vias de ação. Neste sentido, esta tese tem como enfoque compostos aromáticos derivados de fenantreno, em especial a molécula 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona) ligada ao cobre (Cu^{2+}).

1,10-fenantrolina-5,6-diona e derivados metálicos

Moléculas derivadas de fenantreno são empregadas na pesquisa por seus efeitos antiproliferativos, antialérgicos, espasmolíticos, ansiolíticos, citotóxicos, antiinflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos, com diversos estudos de atividade frente a vírus, bactérias e fungos (TÓTH et al., 2018). Fenantreno é um hidrocarboneto

aromático policíclico composto de três anéis de benzeno fundidos, pertencente 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 (KOVÁCS *et al.* 2008).

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). Neste sentido, o derivado 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona) (Figura 3A) 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, 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.

Complexos metálicos vêm despertando o interesse de pesquisadores com modo de ação diferentes daquelas moléculas apenas com unidades orgânicas; além disso, seu caráter tridimensional vem sendo associado a melhores taxas de sucesso clínico. Recentemente, foi revisado a importância e funcionalidade de complexos contendo ouro, gálio, bismuto, rutênio, iridium, rênio e prata (FREI *et al.*, 2020). 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 (MCKERROW *et al.*, 1999). Recentemente foi demonstrado a ação frente

à *Leishmania braziliensis* com inibição irreversível da motilidade do parasito, além da interação com metalopeptidase GP63 capaz de intervir no processo de interação do parasita com células macrófagos (LIMA *et al.*, 2021).

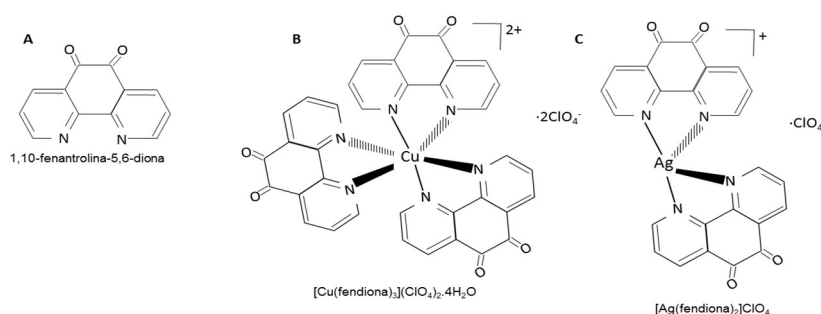


Figura 3: Estruturas químicas: (A) fendiona, (B) Cu-fendiona e (C) Ag-fendiona.

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 1,10-fenantrolina e fendiona livre ou ligada a metais de prata e cobre frente a diferentes linhagens celulares tumorais e normais e não observaram seletividade. Outro estudo verificou a toxicidade dos compostos comparada a da cisplatina, potente agente antineoplásico utilizado na clínica, e valores de CC_{50} 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 o potencial terapêutico desses compostos não será limitada por 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 àquelas 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*. Na investigação da ação tricomonocida da molécula de fendiona e seus

complexos metálicos, a potente e seletiva atividade dos compostos já foram descritas, onde a fendiona apresenta $IC_{50} = 6,57 \mu M$ e $MIC = 42,04 \mu M$, $[Ag (fendiona)_2]^+$ possui $IC_{50} = 2,84 \mu M$ e $MIC = 21,02 \mu M$ e $[Cu (fendiona)_3]^{2+}$ com $IC_{50} = 0,87 \mu M$ e $MIC = 8,84 \mu M$ (RIGO *et al.*, 2018). Ainda, o estudo compara os valores obtidos para MTZ de $IC_{50} = 1,64 \mu M$ e $MIC = 9,71$, demonstrando que os compostos são potentes. A combinação de cobre-fendiona e MTZ frente ao isolado de menor susceptibilidade apresentou efeito sinérgico em concentração reduzida (RIGO *et al.*, 2018). Desta forma, cobre-fendiona desperta atenção como uma promissora molécula de interesse farmacêutico.

Nanotecnologia aplicada à via vaginal

Diversas características dos nanomateriais têm despertado o interesse dos pesquisadores: (I) o tamanho comparável com moléculas biológicas permite integração em processos fisiológicos; (II) grande área de superfície possibilita o transporte de maior quantidade de carga; (III) versatilidade de propriedades físico-químicas a fim de melhorar o direcionamento, absorção e reconhecimento molecular dos nanocarreadores; (IV) direcionamento adequado permite aumento de sensibilidade, redução de efeitos adversos, melhor detecção dos agentes de diagnóstico e aumento da biodisponibilidade; (V) estabilidade permitindo uma ação a longa distância e biodistribuição otimizada. A versatilidade destes nanossistemas se devem também devido as diferentes funcionalidades de superfícies que podem ser programadas para melhorar a interação com o meio bem como a capacidade de transportar diferentes quantidades de fármacos, tanto adsorvida na superfície como solubilizado em seu interior (BARKALINA, 2014).

Um grande interesse por parte dos pesquisadores, sobretudo da área farmacêutica, tem crescido em relação à busca de novos tratamentos para tricomoníase, IST que acomete principalmente a população feminina. A via vaginal apresenta interessantes características para administração de fármacos, como por exemplo, (i) grande superfície de contato, (ii) boa permeabilidade a muitos fármacos, (iii) elevada irrigação sanguínea, (iv) relativa facilidade de administração do fármaco, (v) evita o metabolismo de primeira passagem que os fármacos sofrem no fígado quando administrados por via oral, (vi) redução da incidência e severidade de efeitos adversos gastrointestinais (BONFERONI *et al.* 2008; VALENTA 2005; BALOGLU *et al.* 2009, NEVES *et al.*, 2021).

Apesar das grandes vantagens apresentadas por esta via, o ambiente característico desta mucosa, como a presença do muco, reduz o tempo de residência de fármacos quando

estes são administrados (CU *et al.* 2011). Trata-se da descarga vaginal, conhecida como muco, que desempenha um papel importante na capacidade de absorção de fármacos e pode ser uma estratégia utilizada para aumentar adesão de formulações nesta mucosa. Neste sentido, é interessante utilizar estratégias que possibilitem que a formulação seja mantida por um maior período em contato com a mucosa. Portanto, formulações contendo fármacos para serem aplicados nesta via devem ser capazes de contornar todas essas dificuldades, somando-se à necessidade de uma baixa propensão para causar irritação genital e toxicidade sistêmica (VALENTA 2005, VANIC *et al.* 2013). No que se refere ao aumento da mucoadesividade de formulações vaginais, duas estratégias podem ser utilizadas: i) incorporação do ativo em polímeros adesivos e ii) incorporação do ativo em nanopartículas poliméricas adesivas. No que se refere à primeira estratégia, um interessante polímero para aplicação em mucosas é a quitosana, o único polímero pseudonatural catiônico. Hidrogéis de quitosana são obtidos através da interligação entre as cadeias desse biopolímero. Estes apresentam diversas aplicações na área farmacêutica para diferentes vias de administração, como liberação controlada de fármacos através da via oral e intramuscular e aplicação de fármacos sobre a pele e mucosas (RINAUDO *et al.* 2006; FRANK *et al.* 2017). Quando aplicada em tecidos e mucosas, a quitosana é capaz de permanecer mais tempo no local em contato com o ferimento devido a sua propriedade mucoadesiva (PERIOLI *et al.* 2008). A pectina é outro polímero que vem sendo proposto para aplicação em mucosa de trato gastrointestinal (THIRAWONG *et al.*, 2008). Recentemente foi demonstrado que hidrogel a base de pectina para tratamento de melanoma, apresentando boa adesividade e penetração na pele (GAZZI *et al.*, 2020).

A incorporação do ativo em nanocápsulas poliméricas adesivas visando aplicação vaginal representa uma aplicação moderna e vantajosa, pois os sistemas nanoestruturados além de proteger o ativo da degradação e permitir uma liberação controlada do mesmo, são capazes de aumentar o tempo de contato do ativo com a mucosa e aumentar a sua penetração no tecido vaginal (FRANK *et al.* 2014; CAMELLA *et al.* 2015; FRANK *et al.* 2017). A associação de nanocápsulas em hidrogéis de quitosana e pectina representa uma grande potencialidade, pois representa a união de dois sistemas distintos. Por um lado, o hidrogel de quitosana e pectina com a capacidade de formação de filme e bioadesividade que garante uma liberação homogênea sem perda do fármaco. Por outro lado, os sistemas nanoparticulados que garantem uma liberação controlada e prolongada, assim como proteção ao fármaco, além de entrega e ação em local específico (SHAFFAZICK *et al.*

2003; VALENTA *et al.* 2004). Sendo assim, a incorporação de nanocápsulas em hidrogéis de quitosana e pectina ainda não foi proposta como estratégia de entrega de fármaco no tecido vaginal e representa uma interessante abordagem para doenças como a tricomoníase, candidíase e vaginite bacteriana.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi investigar o mecanismo de morte induzido por Cu-fendiona, com foco no metabolismo oxidativo e na produção de peptidases de *T. vaginalis*, bem como a ação deste composto sobre patógenos vaginais e por fim desenvolver uma formulação nanotecnológica para aplicação vaginal de Cu-fendiona para o tratamento da vaginite infecciosa, especialmente a tricomoníase.

Objetivos específicos:

1. Revisar os principais mecanismos de resistência e de novos compostos frente a tricomoníase, candidíase e vaginose bacteriana;
2. Avaliar a ciência translacional da tricomoníase, da pesquisa básica aos ensaios clínicos;
3. Avaliar a ação da fendiona livre e complexada aos metais prata e cobre no metabolismo oxidativo do protozoário *T. vaginalis*;
4. Investigar as vias de morte celular de *T. vaginalis* após tratamento com cobre-fendiona
5. Avaliar o efeito do tratamento com cobre-fendiona na ação proteolítica das peptidases de *T. vaginalis*;
6. Avaliar o efeito do complexo metálico na viabilidade e capacidade de formação de biofilme em leveduras de espécies de *Candida* e em bactérias causadoras de vaginite;
7. Preparar suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo cobre-fendiona e caracterizá-las quanto ao tamanho, potencial zeta, pH, morfologia e estabilidade física;
8. Avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* de nanocápsulas poliméricas contendo cobre-fendiona.
9. Desenvolvimento e caracterização de hidrogéis contendo quitosana e pectina.

CAPÍTULO I: Rigo, Graziela Vargas; Frank, Luiza Abrahão; Galego, Giulia Bongiorno; Santos, André Luis Souza; Tasca, Tiana. Novel Treatment Approaches to Combat Trichomoniasis, a Neglected and Sexually Transmitted Infection Caused by *Trichomonas vaginalis*: Translational Perspectives. **Venereology.**

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 55 – 88

Rigo GV, Frank LA, Galego GB, Santos ALS, Tasca T. Novel Treatment Approaches to Combat Trichomoniasis, a Neglected and Sexually Transmitted Infection Caused by *Trichomonas vaginalis*: Translational Perspectives. Venereology. 2022; 1(1):47-80. <https://doi.org/10.3390/venereology1010005>

CAPÍTULO II: Graziela Vargas Rigo, Júlia Biz Willig, Michael Devereux, Malachy McCann, André Luis Souza dos Santos, Tiana Tasca.

Oxidative damage by 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its silver and copper complexes lead to apoptotic-like death in *Trichomonas vaginalis*.

Manuscrito será submetido para *International Journal of Antimicrobial Agents*

O capítulo II, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as 91 -112, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição da investigação dos mecanismos de morte e o efeito no metabolismo oxidativo responsáveis pela atividade tricomonocida da fentiona livre e ligada a metais, cobre e prata.

CAPÍTULO III: Graziela V. Rigo, Fernanda Cardoso, Matheus Mendonça Pereira, Michael Devereux, Malachy McCann, André Luis Souza dos Santos, Tiana Tasca. *In vitro* evaluation and docking of copperphendione against peptidases of *Trichomonas vaginalis*. **Manuscrito será submetido para *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology***

O capítulo III, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 115 -140, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição da investigação do efeito tricomonicida do complexo metálico cobre-fendiona no metabolismo das peptidases de *T. vaginalis*.

CAPÍTULO IV: Graziela V. Rigo, Fernanda Cardoso, Alexandre José Macedo, Michael Devereux, Malachy McCann, André Luis Souza dos Santos, Tiana Tasca. Antimicrobial and antibiofilm activity of copperphendione on commensal bacterial and fungal strains responsible for dysbiosis on vaginal microbiota. **Manuscrito será submetido para**
Microbes and Infection

O texto completo do capítulo IV, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 143 -154, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta a descrição da investigação do efeito do complexo metálico cobre-fendiona frente a bactérias e leveduras causadoras de vaginite infecciosa.

CAPÍTULO V: Resultados preliminares do desenvolvimento de formulação intravaginal com nanocápsulas poliméricas contendo cobre-fendiona, realizado em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Silvia Stanisçuaski Guterres, do Grupo de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Faculdade de Farmácia, UFRGS

O texto completo do capítulo V, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 157 -173, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição do desenvolvimento e caracterização de formulação nanotecnológica contendo complexo metálico cobre-fendiona com ação anti-*T. vaginalis*.

DISCUSSÃO GERAL

A saúde e bem-estar da mulher estão intimamente relacionados com a manutenção de uma microbiota vaginal saudável e a diversidade de espécies de *Lactobacillus*. Estados disbióticos vaginais são caracterizados pelo decréscimo da quantidade de *Lactobacillus* spp. e aumento de uma microbiota composta por diferentes microrganismos, como *Trichomonas vaginalis*, espécies de *Candida*, *Gardnerella vaginalis*, além da abundante presença de estreptococos, estafilococos e enterobactérias. Além dos sintomas inflamatórios causados pela presença de patógenos, a disbiose está relacionada com o surgimento de diversas complicações: (i) aumento na transmissão e aquisição de HIV e outras IST; (ii) ascensão dos microrganismos ao endométrio que leva à doença inflamatória pélvica caracterizada por endometrite, salpingite, parametrite, ovarite, abscesso tubo-ovariano, peritonite pélvica e peri-hepatite; (iii) participação como fonte primária de infecção na cavidade amniótica causando parto prematuro e (iv) infecções maternas no período pós-parto e sepses em neonatos (VAN DE WIJGERT *et al.* 2017).

Os impactos financeiros dessas infecções bem como as sequelas geradas já foram alvo de investigação por diferentes pesquisadores que demonstraram o alto custo para a saúde pública. 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 US\$ 167 milhões por ano (CHESSON *et al.* 2004). A estimativa global para tratamento de casos de vaginose bacteriana (VB) varia entre US\$ 3,7– US\$ 6,1 bilhões. As sequelas relacionadas a VB, como nascimentos prematuros e casos de HIV, foram responsáveis por quase triplicar esse valor nos EUA (PEEBLES *et al.*, 2019). Ainda, os custos para tratamento de candidíase vulvovaginal recorrente somam US\$ 1,8 bilhões no mundo (DENNING *et al.* 2018). Considerando a presença dos patógenos no ambiente vaginal como agentes facilitadores da aquisição de diferentes IST, o Centro de Controle de Doenças e Prevenção dos EUA (CDC) estimou que em 2018 o custo total para tratamento de IST no país totalizou quase US\$16 bilhões, sem contar o custo relacionado à perda de produtividade e de prevenção a essas infecções. Nesse levantamento também foi demonstrado que clamídia, tricomoníase, herpes genital e HPV respondem por 98% de todas as ISTs prevalentes e, entre as novas ISTs ocorridas em 2018, são responsáveis por 93% dos casos (CDC, 2021). A importância e a recorrência dos casos de vaginite infecciosa, combinadas com a não adesão, falhas no tratamento e pressão seletiva devido às altas doses dos medicamentos têm levado a um cenário preocupante de resistência.

Sendo assim, o anexo 1 desta tese relacionou os principais mecanismos de resistência bem como a vias de ação dos novos compostos frente a *T. vaginalis*, *G. vaginalis* e espécies de *Candida* (RIGO E TASCA., 2020). Para a tricomoníase foi descrito que as principais vias relacionadas à resistência atuam na organela produtora de energia denominada de hidrogenossomo, capacidade de remoção do oxigênio, conteúdo de ferro intracelular, presença de fragmento de espaçador transcrito interno (do inglês, ITS), ocorrência de polimorfismo de nucleotídeo único, além da presença de endosimbiontes como *Mycoplasma hominis* e vírus de *T. vaginalis* (TVVs). Na vaginose bacteriana causada por *G. vaginalis* resistente, os principais mecanismos relacionados à falha de tratamento envolvem a formação de biofilme, presença de genes responsáveis por inativar fármacos, além da presença de diferentes biotipos genéticos capazes de apresentar maiores níveis de resistência. Por fim, espécies de *Candida* causadoras de vulvovaginite apresentaram capacidade de driblar o efeito antifúngico devido a capacidade de formação de biofilme, através de bombas de efluxo e alteração no sítio de ligação por alteração da expressão do gene *ERG11*. De fato, a resistência antimicrobiana é uma realidade que vem ameaçando o mundo todo e surge a partir da tolerância natural dos microrganismos aos fármacos, resultado da adaptação frente à pressão natural ou causada pela intensa exposição a agentes biocidas. No contexto da microbiota vaginal, a combinação de diferentes mecanismos de resistência associados à capacidade de virulência dos microrganismos cria um cenário de preocupação no tratamento de doenças infecciosas ginecológicas.

A presença de *T. vaginalis* na microbiota vaginal foi associada a redução de *Lactobacillus* spp. e aumento de espécies bacterianas anaeróbicas, responsáveis pela vaginose bacteriana (BROTMAN *et al.*, 2012). A relação casual entre tricomoníase e VB ainda não esteja completamente elucidada. Sabe-se que o estabelecimento do protozoário *T. vaginalis* no sítio de infecção é acompanhado pela redução de *Lactobacillus* spp. e aumento do pH para funcionamento adequado de fatores de virulência secretados pelo parasito, como o fator de descamação celular (do inglês, CDF) que exerce efeitos citopáticos com atividade ótima em pH 6,5 (PETRIN *et al.*, 1998). A capacidade de fagocitose do protozoário permite a ingestão de *Lactobacillus*, leucócitos, eritrócitos e células epiteliais vaginais enquanto favorece o estabelecimento de bactérias associadas à VB (ADDIS *et al.* 1997). Recentemente foi demonstrado que bactérias disbióticas atuam como patobiontes para *T. vaginalis*, modulando a ligação do parasito à mucina e células

vaginais, formando biofilmes que favorecem a adesão do parasito e causando efeitos cumulativos no epitélio ao aumentar a taxa de apoptose celular (HINDERFELD *et al.*, 2020).

Considerando a importância do protozoário *T. vaginalis* no cenário disbiótico vaginal, a busca de novos alvos e moléculas com ação tricomonocida possui extrema relevância perante o cenário brasileiro e mundial desta infecção. Neste sentido, o capítulo I desta tese trás o atual cenário da pesquisa translacional no cenário da tricomoníase (RIGO *et al.*, 2022). A revisão demonstra a eficácia de compostos sintéticos e produtos naturais utilizando modelos experimentais *in vitro*, com efeitos superiores aos tratamentos convencionais. No entanto, a falta de um modelo *in vivo* para avaliação da resposta ao tratamento tem um efeito prejudicial ao progresso nessa área. Além disso, foi observado que a realização de ensaios clínicos para o tratamento da tricomoníase está direcionado a busca de novas vias de administração para os atuais medicamentos aprovados pelo FDA. Na última década, o único caso de sucesso para tratamento desta IST foi o secnidazol. Inicialmente aprovado para tratamento da vaginose bacteriana e recentemente aprovado para o tratamento da infecção por *T. vaginalis*.

Nosso grupo demonstrou a potente atividade tricomonocida da molécula cobre-fendiona, apresentando valores de MIC e IC₅₀ comparáveis ao metronidazol e seletividade maior ao parasito do que frente a linhagens não tumorais e eritrócitos (RIGO *et al.*, 2018). Sendo assim, essa tese teve como principal objetivo a caracterização dos mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-*T. vaginalis* da molécula cobre-fendiona, perfil de susceptibilidade frente a leveduras e bactérias encontradas em um ambiente vaginal alterado, bem o desenvolvimento e caracterização de uma formulação nanotecnológica contendo cobre-fendiona para aplicação intravaginal. O mecanismo de ação envolvido na atividade anti-*T. vaginalis* foi dividido em duas sessões, sendo que o capítulo II se dedica a extensa investigação do tipo de morte celular com participação do metabolismo oxidativo neste processo e o capítulo III está relacionado com o efeito frente à ação das peptidases e no impacto na virulência do parasito. A avaliação dos alvos de uma molécula tem papel chave no desenvolvimento de um novo fármaco, visto que erros na validação desta etapa do processo podem levar a falhas clínicas importantes e baixas taxas de aprovação do futuro medicamento. Segundo Gashaw e colaboradores, diversos requisitos são importantes no momento de definir os alvos de moléculas promissoras, como a função comprovada de determinado alvo na fisiopatologia de uma doença, a

distribuição não uniforme do alvo pelo corpo todo e se há biomarcadores capazes de monitorar a eficácia da nova terapia (GASHAW *et al.*, 2012). Sendo assim, o conhecimento detalhado da atuação da molécula promissora deve abranger as classes de alvos envolvidas no efeito bem como o modo de ação.

O mecanismo de morte de trofozoítos de *T. vaginalis* gerado pelos compostos fendiona e seus derivados metálicos de prata e cobre foi explorado no capítulo II desta tese. O conhecimento acerca das vias ativadas na morte celular é utilizado para definir a forma de atuação de moléculas com atividades biológicas. Avaliação da morfologia, além da investigação dos sinais bioquímicos e imunológicos, são ferramentas importantes para definição do tipo de morte celular programada quando células entram em contato com agente estressor (GALLUZZI *et al.*, 2018). Após tratamento com as fendiona e derivados metálicos, aspectos morfológicos como encolhimento do citoplasma, exposição de fosfatidilserina no lado externo da membrana plasmática e espalhamento da granulosidade podem ser observados. Observações dos resultados direcionam para uma morte mediada por vias apoptóticas. Este processo, normalmente mediado por mitocôndrias, já foi observado por Chose *et al.* (2002) no protozoário amitocondriado *T. vaginalis* após tratamento com estaurosporina, inibidor de proteínas quinases. Buscas na base de dados Uniprot indicaram a existência de homólogos de fatores de apoptose DNAses ZEN1, NUC1 e TSN no parasito, indicando que fatores de apoptose mitocondriais foram substituídos por fatores nucleares em *T. vaginalis* (KACZANOWSKI *et al.*, 2011). Seguindo na investigação do tipo de morte, o estudo avaliou a expressão de duas enzimas relacionadas à morte apoptótica: (i) poli[ADP-ribose]polimerase (PARP) responsável por sinalização e reparo de DNA quando ocorre dano extremo e (ii) aminofosfolipídio translocase (APLT-1) capaz de manter a fosfatidilserina no interior da célula (DOLIS *et al.*, 1997; VILLAMIL *et al.*, 2020). Os resultados estão em acordo com outro estudo do grupo que avaliou o tipo de morte celular nos trofozoítos após tratamento com derivado de 2,4-diamina-quinazolina, e indica que a redução na expressão de ambos os genes está relacionada à via de morte por apoptose (WEBER *et al.*, 2021).

Vias de apoptose que dependem ou não de mitocôndria são estritamente relacionadas com diferentes formas de estresse, entre as quais pode-se destacar a participação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Pequenas quantidades de EROs são associadas com a manutenção da homeostasia celular, ativando a proteína supressora

de tumor p53 para realizar parada do ciclo celular, reparo e a sobrevivência do DNA, enquanto altas doses são capazes de ativar vias de morte celular, como apoptose (REDZA-DUTORDOIR *et al.*, 2016). Assim, a capacidade de detoxificação no parasito foi investigada após tratamento com fendiona e derivados metálicos e um aumento significativo das EROs foi observado. *T. vaginalis* possui enzimas responsáveis pela metabolização formas de oxigênio capazes de causar dano, como ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio, transformando em formas seguras para evitar danos relacionados ao estresse oxidativo (LEITSCH *et al.* 2018).

Após o aumento nas EROs observado através da sonda DCF-DA, o impacto no perfil oxidativo do tratamento com os compostos foi avaliado pela expressão gênica relativa das enzimas NADH oxidase, Flavina reductase (FR), superóxido dismutase (SOD), proteínas flavodiiron (FDP), flavoproteína contendo ferro e enxofre (ISF), proteína osmoticamente induzível (OsmC) e rubreritina e comparado com o tratamento padrão com metronidazol. Os resultados permitiram propor a via de ação dos compostos fendiona e derivados metálicos sob o metabolismo oxidativo do parasito, conforme representação gráfica na figura 6 do capítulo II. Após o tratamento, houve redução da expressão gênica das enzimas NADH oxidase, flavina reductase, superóxido dismutase, flavoproteína contendo ferro e enxofre, proteína osmoticamente induzível e rubreritina, e aumento da expressão de proteínas flavodiiron. O efeito da redução das enzimas citosólicas NADH oxidase, flavina reductase, superóxido dismutase dificulta a metabolização do oxigênio vindo do meio extracelular, e sua redução produzirá um intermediário altamente reativo, ânion capaz de liberar ferro de moléculas, como observado na enzima Fe-superóxido dismutase, e proteínas que contenham centro ferro-enxofre, como na enzima ISF, ambas pertencentes à via de detoxificação deste 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.

A sequência do genoma de *T. vaginalis* é de 160 Mb com cerca de 60 mil genes codificadores de proteínas, sendo uma das maiores capacidades de codificação entre os eucariotos, e 65% é repetitivo (CARLTON *et al.*, 2007). Devido a sua condição microaerofílica e um estilo basicamente anaeróbico no local de infecção, 57 loci codificadores de proteínas antioxidantes e redoxes potenciais foram descritos quando o genoma foi sequenciado em 2007. Assim, apesar de muitos estudos relacionados à resistência ao MTZ demonstrarem efeito nas enzimas do sistema antioxidante do trofozoíto, isto não significa que todas as sequências gênicas codificadoras para essas enzimas sofram o mesmo efeito, que é dependente de fatores como nutrientes, concentração de oxigênio, os quais determinarão as condições para alteração na transcrição (KULDA, 1999; LEITSCH *et al.*, 2014). Além disso, no genoma deste protozoário foram encontradas cerca de 800 proteínas de superfície envolvidas em mecanismos de patogenicidade, sendo dessas 658 proteínas semelhantes a BspA e 77 proteínas do tipo GP63, metalopeptidases homólogas as leishmanolisinas, responsáveis por mecanismos de virulência e patogenicidade em *Leishmania major* (YAO *et al.*, 2003; CARLTON *et al.*, 2007).

Considerando a importante contribuição das peptidases para o estabelecimento da patogênese do parasito, o capítulo III da tese apresenta os resultados do impacto das moléculas no degradoma do trofozoíto, bem como o efeito na virulência de *T. vaginalis*. Segundo Carlton e colaboradores (2007), o degradoma do protozoário *T. vaginalis* é composto por mais de 400 genes de peptidases, apresentando 5 diferentes tipos catalíticos: cisteína (220), metalo (123), serina (80), treonina (17) e aspártico (6). Peptidases possuem a capacidade de hidrolisar as ligações peptídicas em proteínas e peptídeos, sendo amplamente encontrado - desde vírus a mamíferos - e o tipo de sítio catalítico está relacionado ao mecanismo e resíduos de aminoácidos envolvidos na atividade (RAWLINGS *et al.* 2014).

A avaliação preliminar demonstrou que, após o tratamento com os compostos, os trofozoítos tiveram sua capacidade de degradação do substrato proteico alterado. Além disso substratos específicos demonstraram o efeito do cobre fendiona, frente a cisteína e metalopeptidases. De fato, essas duas classes representam mais da metade das peptidases presentes no parasito e são amplamente estudadas devido suas propriedades de virulência,

como rompimento do citoesqueleto, hemólise, citotoxicidade, citoaderência, degradação de proteínas e imunoglobulinas e indução de apoptose de células do hospedeiro (ARROYO *et al.*, 2015). Após uma análise mais detalhada da atividade das peptidases através da identificação de proteínas por análises de espectrometria de massas de resíduos extraídos de gel SDS contendo gelatina, foi novamente identificada alteração no perfil de clivagem proteolítica de peptidases do tipo cisteína (ubiquitina hidrolase) e metalo (GP63).

A fim de verificar a alteração na expressão gênica relativa dessas enzimas, foram selecionadas 3 cisteína peptidases do clã CA, que apresentaram relação com processos apoptóticos: calpaína, catepsina L e B. Calpaínas são amplamente descritas em eucariotos multicelulares, mas que vem demonstrando uma expansão importante no grupo dos organismos unicelulares. De acordo com o banco de dados online para peptidases e seus inibidores (MEROPS), essa classe pertence à família C2 de endopeptidases de cisteína dependentes de Ca^{2+} , encontrada em diversos protozoários e 10 homólogos descritos para *T. vaginalis*. As calpaínas clássicas consistem em quatro domínios conservados, sendo o domínio central de protease catalítica (CysPc) com função descrita para apoptose, fusão de membrana, motilidade celular e transdução de sinal (ZHAO *et al.*, 2012; SORIMACHI *et al.*, 2011). Catepsinas no tipo L e B são representantes da família C1 podendo ser direcionadas para compartimentos de vesículas intracelulares ou secretadas e estão relacionadas com a morte celular por atuar na degradação de diversas proteínas anti-apoptóticas. Recentemente foi demonstrada a participação dessas enzimas no processo de morte celular em *T. vaginalis*, onde o aumento significativo da expressão gênica foi relacionado a mecanismo de apoptose (ARROYO *et al.*, 2015; WEBER *et al.*, 2021). Também foi verificado o efeito sobre as metalopeptidases TvMP50 e GP63 do trofozoíto. MP50 é uma metalopeptidase da família M24, descrita como metionil aminopeptidase 1 e é descrita como uma enzima citosólica importante para o crescimento de *Toxoplasma gondii* (RAWLINGS E BARRETT, 1993; YANG *et al.* 2016). No protozoário *T. vaginalis* participa da clivagem mTOR da célula hospedeira, além de apresentar imunogenicidade no soro de pacientes masculinos, possuir localização citoplasmática e apresentar o zinco como metal importante para sua expressão genica (QUINTAS-GRANADOS *et al.*, 2013; PUENTE-RIVERA *et al.*, 2017; ARREOLA *et al.*, 2018). A outra metalopeptidase investigada, GP63, pertence à família M8 e contém a metalo-endopeptidases leishmanolisina e seus homólogos como principais representantes

(RAWLINGS E BARRETT, 1993). Amplamente encontrada em protozoários como *E. histolytica*, *T. cruzi*, *T. brucei*, e *Leishmania spp.* (GRANDGENETT *et al.*, 2000; LACOUNT *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.* 2011). Em *T. vaginalis* foi descrita sua localização na membrana plasmática e possui grande relevância em processos de citotoxicidade no hospedeiro (MA *et al.*, 2011). Hoje é reconhecido que a citotoxicidade gerada pelo parasito é mais do que apenas um mecanismo de morte das células hospedeiras, mas representa uma ferramenta importante na manutenção de um ambiente favorável para ciclo de vida do parasita. Promover ou prevenir a morte celular torna-se pode variar de acordo com diferentes variáveis intrínsecas relacionadas à infecção, como a natureza e carga do patógeno, o local da infecção e o tempo necessário até que ocorra morte celular (Bosurgi *et al.*, 2021). De fato, a redução na expressão das metalopeptidases pode ser refletida na redução do efeito citotóxico do parasito frente a células epiteliais vaginais, como observadas neste estudo.

Os resultados obtidos na análise para cobre-fendiona sugerem que essas peptidases não estão envolvidas na ativação das vias apoptóticas, mas sofrem alteração devido à perturbação no metabolismo proteolítico do parasito, demonstrando o efeito multialvo da molécula. O efeito inibitório frente às metalopeptidases de *T. vaginalis* encontradas neste estudo representa uma contribuição importante para o efeito do composto cobre-fendiona. Além de apresentar efeito tricomonicida em concentrações menores que observado para fendiona e Ag-fendiona (RIGO *et al.*, 2018), foi demonstrado que o composto não apenas leva o trofozoíto a morte por perturbação no metabolismo oxidativo e proteolítico, como também causa redução dos efeitos tóxicos nas células. Em uma realidade onde microrganismos estão em constante adaptação para desenvolvimento de novos mecanismos de resistência, uma molécula que é capaz de alterar o funcionamento do parasito por diferentes vias, possui maior capacidade de driblar a pressão seletiva causada pela terapia.

Tendo em vista que fatores de resistência de outros microrganismos localizados no mesmo ambiente pode favorecer a falha na terapia tricomonicida, o capítulo IV da tese teve como objetivo a triagem do efeito do cobre-fendiona frente a diferentes espécies de *Candida* responsáveis por contribuir para disbiose do ambiente vaginal. Os resultados preliminares demonstram que o composto cobre-fendiona é ativo frente a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* causando um efeito fungicida em uma faixa entre 6,03 e 3,01 µg/mL, valores comparáveis aos antifúngicos testados. O processo

de apoptose já foi descrito em leveduras de *C. albicans* quando expostas a 1,10-fenantrolina, precursora dos compostos utilizados neste estudo. No estudo de Coyle e colaboradores (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). Além disso, o composto demonstrou ser capaz de reduzir a formação de biofilme das diferentes espécies de *Candida* em concentrações entre 96,5 e 12,06 µg/mL. A formação de biofilmes fúngicos associados ao epitélio da vagina além da capacidade de infiltração na camada epitelial são fatores preocupantes em casos de candidíase vulvovaginal, ainda mais quando acompanhado com alterações histopatológicas e indução de resposta inflamatória. A redução da susceptibilidade frente ao tratamento quando há formação de biofilmes já foi descrito para muitos microrganismos e é uma realidade encontrada em casos de vaginite infecciosa (WU *et al.*, 2020).

Considerando o exposto, há necessidade de desenvolvimento de terapia alternativa para tricomoníase que apresente efetividade adequada frente ao protozoário, segurança e redução de efeitos adversos a fim de aumentar a adesão do paciente. Além disso, a utilização de uma molécula que, não apenas reduz a viabilidade do parasito *T. vaginalis*, bem como é capaz de atuar frente a outros agentes causadores de disbiose vaginal pode ser capaz de reduzir os casos recorrentes de vaginite e melhorar a qualidade de vida das mulheres expostas à infecção. Ainda, a capacidade de adesão em superfícies abióticas, como dispositivos intrauterinos (DIU) e anel vaginal, foi descrita para isolados de *Candida* spp. e *T. vaginalis* (SANTOS *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2020), dificultando a ação efetiva de terapias orais e possibilitando que as células microbianas das superfícies abióticas sejam capazes de retomar a infecção no local. De fato, a contaminação microbiana frente a dispositivos médicos é uma preocupação no mundo todo por levar a falha de tratamentos, cronicidade das infecções e ainda causar altas taxas de morbimortalidade. Entre as estratégias descritas para superar a infecção microbiana frente a superfícies bióticas e abióticas, a utilização de nanotecnologia vem sendo amplamente estudada para aplicação biomédica (KHATOON *et al.*, 2018). Dessa forma, o capítulo V dessa tese apresenta os resultados preliminares do desenvolvimento e caracterização de uma formulação de nanocápsulas poliméricas contendo cobre-fendiona para aplicação intravaginal.

O desenvolvimento de uma formulação intravaginal teve como premissas a necessidade de uma terapia que atingisse concentrações maiores do composto no local de ação, não depender do metabolismo de primeira passagem e reduzir a possibilidade de efeitos adversos sistêmicos. Para isso, foram desenvolvidas nanocápsulas poliméricas contendo Poli(ϵ)-caprolactona (PCL), Span 60[®], cobre-fendiona e triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico na fase orgânica e polissorbato 80 com água Milli-Q[®] compondo a fase aquosa. O preparo ocorreu através de deposição interfacial do polímero pré-formado e as análises físico-químicas foram realizadas em diferentes dias através de metodologias que analisaram tamanho de partícula, potencial zeta e pH. Utilizando técnicas como difração a laser, espalhamento de luz dinâmico e rastreamento das nanopartículas foi possível verificar um tamanho de partícula adequada de 199,53 nm imediatamente após o preparo e 195,07 após 28 dias mantido à temperatura ambiente, além disso baixos índices de polidispersão foram observados nesse período. O resultado está de acordo com o que é descrito na literatura para nanocápsulas e sofre influência da natureza do óleo utilizado no núcleo e do efeito estabilizador ao redor das gotículas atribuído ao polímero (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O polímero PCL tem demonstrado ser adequado para aplicação vaginal, onde demonstrou a liberação eficiente de doxiciclina por mais de 14 dias em fluido vaginal simulado além de permitir a liberação do antiviral tenofovir a partir de dispositivos intravaginais com o polímero (DANG, *et.*, 2013; PATHAK *et al.*, 2015). O potencial zeta observado está relacionado com a carga de superfície e ocorre pela presença de grupos funcionais contendo oxigênio em sua superfície e, portanto, apresentam densidade parcial negativa em sua interface. Os valores de potencial zeta próximos de zero são consequência do mecanismo estérico de estabilização pelo polissorbato 80, um surfactante não iônico polioxigenado (FIEL *et al.*, 2011). Tendo em vista a aplicação em formulação intra-vaginal, o pH encontrado próximo na faixa próximo àquela observada no ambiente vaginal saudável (3,5 a 4,5) é vantajoso pois propicia o surgimento de um meio adequado para que os *Lactobacillus* spp. possam se estabelecer novamente, reestabelecendo a microbiota vaginal saudável (VALENTA *et* 2005). Por fim, ensaios preliminares da ação das nanocápsulas demonstraram um maior efeito do composto nanoencapsulado (MIC: 6,25 μ M) em comparação do livre (MIC: 12,5 μ M).

As comorbidades do trato genital combinadas com a não adesão ao tratamento, falhas terapêuticas e pressão seletiva devido a altas doses de medicamentos têm levado a um cenário preocupante de resistência à vaginite (SECOR *et al.* 2014). Assim, permanece

a necessidade de determinar se casos assintomáticos de vulvovaginite têm complicações para os indivíduos infectados e seus parceiros sexuais e, além disso, prevê-se que a restrição de tratamento em uma única classe, no caso da tricomoníase, os 5-nitroimidazóis, tornar-se-á gradualmente uma estratégia de saúde pública insustentável. Esforços são necessários para identificar alternativas para prevenir ou tratar essas infecções antes da confirmação desse prognóstico negativo. Neste contexto, a incorporação do composto cobre-fendiona em nanocápsulas poliméricas e sua veiculação em polímero mucoadesivo proverão opções para o tratamento intravaginal tópico visando ao controle da tricomoníase e comorbidades do trato vaginal contribuindo para a saúde da mulher.

CONCLUSÕES

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

- (i) Após tratamento com o cobre-fendiona ocorre ativação de vias de morte celular semelhante a apoptose em *T. vaginalis*;
- (ii) Cobre-fendiona inibe a expressão gênica de enzimas responsáveis pela detoxificação em *T. vaginalis*, gerando um impacto negativo na função do metabolismo oxidativo com aumento de espécies reativas de oxigênio;
- (iii) Redução da capacidade proteolítica do protozoário, com inibição da expressão de peptidases e potencial interação do cobre-fendiona com as metalopeptidases TvMP50 e TvGP63;
- (iv) Redução da citólise de células epiteliais em parasitos pré-tratados com cobre-fendiona;
- (v) Ação antibacteriana, antifúngica e anti-biofilme frente a espécies de *Candida* e agentes causadores de vaginite aeróbia;
- (vi) Desenvolvimento e caracterização de uma formulação de nanocápsulas poliméricas contendo cobre-fendiona com atividade anti-*T. vaginalis* melhorada quando comparado com o composto na sua forma não encapsulada.

Perspectivas

A fim de seguir na elucidação da atividade do cobre-fendiona frente ao *parasito T. vaginalis* e na busca por novas alternativas terapêuticas para a tricomoníase, este estudo tem como perspectivas o desenvolvimento e caracterização de suspensões de nanocápsulas poliméricas mucoadesivas, através:

1. Desenvolvimento de metodologia para análise por HPLC-DAD;
2. Ensaio de citotoxicidade e hemólise;
3. Avaliação da adesividade, penetração e permeação em mucosa vaginal suína.
4. Avaliação da atividade anti-*T. vaginalis* e antimicrobiana da formulação nanotecnológica contendo Cu-fendiona *in vivo* em camundongos e avaliação da toxicidade

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDIS, M. F., RAPPELLI, P., CAPPUCCINELLI, P., FIORI, P. L. Extracellular release by *Trichomonas vaginalis* of a NADP⁺ dependent malic enzyme involved in pathogenicity. *Microb. Pathog.* v.23, p.55–61, 1997.
- AKIMOTO-GUNTHER, L., BONFIM-MENDONÇA, P.S., TAKAHACHI, G., IRIE, M.M., MIYAMOTO, S, CONSOLARO, M.E., SVIDZINSK, T.I. Highlights Regarding Host Predisposing Factors to Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: Chronic Stress and Reduced Antioxidant Capacity. *PLoS One.* v.11, p.e0158870, 2016.
- AL-MOHAMMED HI, HUSSEIN EM. Comparison between secretory leukocytic protease inhibitor and reactive nitrogen intermediates levels in cervicovaginal secretions from symptomatic and asymptomatic trichomoniasis Egyptians patients. *J Egypt Soc Parasitol.* v.36, n.3, p.763-777, 2006.
- AMBROZIO, C. L., NAGEL, A. S., JESKE, S., BRAGANÇA, G. C., BORSUK, S., & VILLELA, M. M. *Trichomonas vaginalis* PREVALENCE AND RISK FACTORS FOR WOMEN IN SOUTHERN BRAZIL. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.58, p.61, 2016.
- AMSEL R, TOTTEN PA, SPIEGEL CA, CHEN KC, ESCHENBACH D, HOLMES KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med.*v.74, n.1, p.14-22, 1983.
- ARREOLA, R. *et al.* *Trichomonas vaginalis* metalloproteinase TvMP50 is a monomeric Aminopeptidase P-like enzyme. *Molecular Biotechnology*, v.60, n.8, p.563-575, ago. 2018.
- ARROYO, R.; CÁRDENAS-GUERRA, R.E.; FIGUEROA-ÂNGULO, E.E.; PUENTE-RIVERA, J.; ZAMUDIO-PRÍETO, 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.
- ATASHILI J, POOLE C, NDUMBE PM, ADIMORA AA, SMITH JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS.*v.22, n.12, p.1493-1501, 2008.
- BALOGLU, E., SENYIGIT, Z. A., KARAVANA, S. Y., & BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Strategies to prolong the intravaginal residence time of drug delivery systems. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences* : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques, v.12, n.3, p.312–336, 2009.
- BARKALINA N, CHARALAMBOUS C, JONES C, COWARD K. Nanotechnology in reproductive medicine: emerging applications of nanomaterials. *Nanomedicine.*v.10, n.5, p.921-938, 2014.
- BAUTISTA CT, WURAPA E, SATEREN WB, MORRIS S, HOLLINGSWORTH B, SANCHEZ JL. Bacterial vaginosis: a synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. *Mil Med Res.*v.3,p.4, 2016.

BELFORT, I., CUNHA, A., MENDES, F., GALVÃO-MOREIRA, L. V., LEMOS, R. G., de LIMA COSTA, L. H., MONTEIRO, P., FERREIRA, M. B., DOS SANTOS, G., COSTA, J. L., DE SÁ FERREIRA, A., BRITO, L., BRITO, L., VIDAL, F., & MONTEIRO, S. *Trichomonas vaginalis* as a risk factor for human papillomavirus: a study with women undergoing cervical cancer screening in a northeast region of Brazil. *BMC women's health*, v.21, n.1, p.174, 2021.

BENCHIMOL, M. Trichomonads under microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, v. 10, n.5, p.528-550, 2004.

BERI, D., YADAV, P., DEVI, H., NARAYANA, C., GADARA, D., & TATU, U. Demonstration and Characterization of Cyst-Like Structures in the Life Cycle of *Trichomonas vaginalis*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v.9, p.430, 2020.

BONFERONI, M. C., SANDRI, G., ROSSI, S., FERRARI, F., GIBIN, S., CARAMELLA, C. Chitosan citrate as multifunctional polymer for vaginal delivery. Evaluation of penetration enhancement and peptidase inhibition properties. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, v.33, n.2, p.166–176, 2008.

BOSURGI L., ROTHLIN, CV. Management of cell death in parasitic infections. *Seminars in immunopathology*, 2021.

BRIGTSEN AK, DEDI L, MELBY KK, HOLBERG-PETERSEN M, RADTKE A, LYNG RV, et al. Comparison of PCR and serotyping of group B *Streptococcus* in pregnant women: the Oslo GBS-study. *J Microbiol Methods*, v.108, p.31–5.

BROTMAN, R. M., BRADFORD, L. L., CONRAD, M., GAJER, P., AULT, K., PERALTA, L., FORNEY, L. J., CARLTON, J. M., ABDO, Z., & RAVEL, J. Association between *Trichomonas vaginalis* and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. *Sexually transmitted diseases*, v.39, n.10, p.807–812, 2012.

BROWN MT, GOLDSTONE HM, BASTIDA-CORCUERA F, DELGADILLO-CORREA MG, MCARTHUR AG, JOHNSON PJ. A functionally divergent hydrogenosomal peptidase with protomitochondrial ancestry. *Mol Microbiol*.v.64, n.5, p.1154-1163, 2007.

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.

CARAMELLA, C. M., ROSSI, S., FERRARI, F., BONFERONI, M. C., & SANDRI, G. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v.92, p.39–52, 2015.

CARLTON JM, HIRT RP, SILVA JC, *et al.* Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*. v.315, n.5809, p.207-212, 2007.

CDC, 2021. <https://www.cdc.gov/std/statistics/prevalence-2020-at-a-glance.htm>. Acessado em 05 de setembro de 2019.

CERDÀ-COSTA N, GOMIS-RÜTH FX. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *Protein Sci.*v.23, n.2, p.123-144, 2014.

CHESSON, H. W., BLANDFORD, J. M., PINKERTON, S. D. Estimates of the annual number and cost of new HIV infections among women attributable to trichomoniasis in the United States. *Sexually transmitted diseases*, 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.; 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.

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.

CONSEIL V, SOËTE M, DUBREMETZ JF. Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother*. v.43, n.6, p.1358-1361, 1999.

COOMBS GH, NORTH MJ. An analysis of the proteinases of *Trichomonas vaginalis* by polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology*. v.86, Pt 1, p.1-6, 1983.

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

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.

CU, Y., BOOTH, C. J., SALTZMAN, W. M. In vivo distribution of surface-modified PLGA nanoparticles following intravaginal delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, v.156, n.2, p.258–264, 2011.

DANG, N. T. T., SIVAKUMARAN, H., HARRICH, D., COOMBES, A. G. A. An Evaluation of Polycaprolactone Matrices for Vaginal Delivery of the Antiviral, Tenofovir, in Preventing Heterosexual Transmission of HIV. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.102, n.10, p.3725–3735, 2013.

- 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.
- DENNING, D.W., KNEALE, M., SOBEL, J.D., RAUTEMAA-RICHARDSON, R., Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. *Lancet. Infect. Dis.*v.18, p.e339-e347, 2018.
- DI CERA E. Serine proteases. *IUBMB Life*.v.61, n.5, p.510-515, 2009.
- DOLIS D, MOREAU C, ZACHOWSKI A, DEVAUX PF. Aminophospholipid translocase and proteins involved in transmembrane phospholipid traffic. *Biophys Chem* v.68, p.221-231, 1997.
- DONDERS GG, RUBAN K, BELLEN G. Selecting anti-microbial treatment of aerobic vaginitis. *Curr Infect Dis Rep*, v.17, n.5, p.24, 2015
- 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. *Biomaterials*, v.17, p.415–422, 2004.
- FARR A, EFFENDY I, FREY TIRRI B, HOF H, MAYSER P, PETRICEVIC L, RUHNKE M, SCHALLER M, SCHAEFER APA, SUSTR V, WILLINGER B, MENDLING W. Guideline: Vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k). *Mycoses*. v.64, n.6, p.583-602, 2021
- FIEL, L. A., REBÊLO, L. M., DE MELO SANTIAGO, T., ADORNE, M. D., GUTERRES, S. S., SOARES DE SOUSA, J., & POHLMANN, A. R. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. *Soft Matter*, v.7, n.16, p.7240, 2011.

FRANK, L. A., CHAVES, P. S., D'AMORE, C. M., CONTRI, R. V., FRANK, A. G., BECK, R. C., POHLMANN, A. R., BUFFON, A., & GUTERRES, S. S. The use of chitosan as cationic coating or gel vehicle for polymeric nanocapsules: Increasing penetration and adhesion of imiquimod in vaginal tissue. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, v.114, p.202–212, 2017.

FRANK, L. A., SANDRI, G., D'AUTILIA, F., CONTRI, R. V., BONFERONI, M. C., CARAMELLA, C., FRANK, A. G., POHLMANN, A. R., & GUTERRES, S. S. Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. *International journal of nanomedicine*, v.9, p.3151–3161, 2014.

GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON S, ABRAMS JM, ADAM D, AGOSTINIS P, *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*; v.25: p.486-541, 2018.

GASHAW, I., ELLINGHAUS, P., SOMMER, A., ASADULLAH, K. What makes a good drug target?. *Drug discovery today*, v.17 Suppl, S24–S30, 2012.

GAZZI, R. P., FRANK, L. A., ONZI, G., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S.. New pectin-based hydrogel containing imiquimod-loaded polymeric nanocapsules for melanoma treatment. *Drug delivery and translational research*, v.10 n.6, p.1829–1840, 2020.

GHOSH, I., MANDAL, R., KUNDU, P., BISWAS, J. Association of Genital Infections Other Than Human Papillomavirus with Pre-Invasive and Invasive Cervical Neoplasia. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, v.10, n.2, p.XE01–XE06, 2016.

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.

GOJE O, MUNOZ JL. Vulvovaginitis: Find the cause to treat it. *Cleve Clin J Med*.v.84, n.3, p.215-224, 2017.

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

GRANDGENETT, P.M. *et al.* Differential expression of GP63 genes in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.110, n.2, p.409-415, out. 2000.

HAINER BL, GIBSON MV. Vaginitis. *Am Fam Physician*.v.83, n.7, p.807-815, 2011.

- HARWICH, M.D.J., ALVES, J.M., BUCK, G.A., STRAUSS, J.F., PATTERSON, J.L., OKI, A.T., GIRERD, P.H., JEFFERSON, K.K. Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies. *BMC Genomics*. v.11, p.375, 2010.
- HERNÁNDEZ HM, MARCET R, SARRACENT J. Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasite*. v.21, p.54, 2014.
- HERNÁNDEZ-ROMANO P, HERNÁNDEZ R, ARROYO R, ALDERETE JF, LÓPEZ-VILLASEÑOR I. Identification and characterization of a surface-associated, subtilisin-like serine protease in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*.v.137, n.11, p.1621-1635, 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.
- HICKEY RJ, ZHOU X, PIERSON JD, RAVEL J, FORNEY LJ. Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. *Transl Res*. v.160, n.4, p.267-282, 2012.
- HINDERFELD, A. S., SIMOES-BARBOSA, A. Vaginal dysbiotic bacteria act as pathobionts of the protozoal pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Microbial pathogenesis*, v.138, p.103820, 2020.
- HONIGBERG, B. M.; BRUGEROLLE, G. Structure. In: HONIGBERG, B. M. (Ed.). *Trichomonads Parasitic in Humans*. New York: Springer, p. 05-35, 1990.
- HOWE, K., KISSINGER, P. J. Single-Dose Compared With Multidose Metronidazole for the Treatment of Trichomoniasis in Women: A Meta-Analysis. *Sexually transmitted diseases*, v.44, n.1, p.29–34, 2017.
- HUANG B, FETTWEIS JM, BROOKS JP, JEFFERSON KK, BUCK GA. The changing landscape of the vaginal microbiome. *Clin Lab Med*. v.34, n.4, p.747-761, 2014.
- 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
- HUANG, X., LI, C., LI, F., ZHAO, J., WAN, X., & WANG, K. Cervicovaginal microbiota composition correlates with the acquisition of high-risk human papillomavirus types. *International journal of cancer*, v.143, n.3, p.621–634, 2018.
- 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: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>. Acesso em: 04 setembro. 2021.

KAAMBO E, AFRICA C, CHAMBUSO R, PASSMORE JS. Vaginal Microbiomes Associated With Aerobic Vaginitis and Bacterial Vaginosis. *Front Public Health*.v.6, p.78, 2018.

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.

KENYON C, COLEBUNDERS R, CRUCITTI T. The global epidemiology of bacterial vaginosis: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol*.v.209, p.505–23, 2013.

KHATOON, Z., MCTIERNAN, C. D., SUURONEN, E. J., MAH, T. F., & ALARCON, E. I. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, v.4, n.12, p.e01067, 2018.

KISSINGER P, ADAMSKI A. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. *Sex Transm Infect*.v.89,n.6, p.426-433, 2013.

KOVÁCS, A.; VASAS, A.; HOHMANN, J. Natural phenanthrenes and their biological activity. *Phytochemistry*, v.69, n.5, p.1084–1110, 2008.

KRAUSS-SILVA L, ALMADA-HORTA A, ALVES MB, CAMACHO KG, MOREIRA MEL, BRAGA A. Basic vaginal pH, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis: prevalence in early pregnancy and risk of spontaneous preterm delivery, a prospective study in a low socioeconomic and multiethnic South American population. *BMC Pregnancy Childbirth*, v.14, n.1, p.107, 2014.

KREISEL, K. M., SPICKNALL, I. H., GARGANO, J. W., LEWIS, F., LEWIS, R. M., MARKOWITZ, L. E., ROBERTS, H., JOHNSON, A. S., SONG, R., ST CYR, S. B., WESTON, E. J., TORRONE, E. A., & WEINSTOCK, H. S.. Sexually Transmitted Infections Among US Women and Men: Prevalence and Incidence Estimates, 2018. *Sexually transmitted diseases*, v.48, n.4, p.208–214, 2021.

KRIEGER, J. N., & REIN, M. F. Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis*: in vitro studies and clinical implications. *The Journal of infectious diseases*, v.146, n.3, p.341–345, 1982.

KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*, v.29, p.199-212, 1999.

KUMMER S, HAYES GR, GILBERT RO, BEACH DH, LUCAS JJ, SINGH BN. Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microb Pathog*, v.44, n.3, p.197-203, 2008.

LACOUNT, D.J. *et al*. Expression and function of the Trypanosoma brucei major surface protease (GP63) genes. *Journal of Biological Chemistry*, v.278, n.27, p.24658-24664, jul. 2003.

LEHKER, M.W.; ALDERETE, J.F. Biology of trichomonosis. *Current Opinion of Infection Disease*, v.13, n.1, p.37-45, 2000.

- 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.; WILLIAMS, C.F.; HRDÝ, I. Redox Pathways as Drug Targets in Microaerophilic Parasites. *Trends in Parasitology*, v.34, n.7, p.576-589, 2018.
- LEON EM, JACOBBER SJ, SOBEL JD, FOXMAN, B.,. Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. *BMC. Infect. Dis*, v.2, n.1,2002.
- LIMA, A., ELIAS, C., OLIVEIRA, S., SANTOS-MALLET, J. R., MCCANN, M., DEVEREUX, M., BRANQUINHA, M. H., DUTRA, P., SANTOS, A. Anti-*Leishmania braziliensis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its Cu(II) and Ag(I) complexes. *Parasitology research*, v.120, n.9, p.3273–3285, 2021
- MA, L. *et al.* Involvement of the GP63 protease in infection of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*, v.109, n.1, p.71-79, jul. 2011.
- MANCILLA-OLEA MI, ORTEGA-LÓPEZ J, FIGUEROA-ANGULO EE, *et al.* *Trichomonas vaginalis* cathepsin D-like aspartic proteinase (Tv-CatD) is positively regulated by glucose and degrades human hemoglobin. *Int J Biochem Cell Biol*.v.97, p.1-15, 2018.
- MASHA, S. C., COOLS, P., SANDERS, E. J., VANECHOUTTE, M., CRUCITTI, T. *Trichomonas vaginalis* and HIV infection acquisition: a systematic review and meta-analysis. *Sexually transmitted infections*, v.95, n.1, p.36–42, 2019.
- MAVEDZENGE SN, POL BV, CHENG H, MONTGOMERY ET, BLANCHARD K, BRUYN G,*et al.* Epidemiological synergy of *Trichomonas vaginalis* and HIV in Zimbabwean and South African women. *Sex Transm Dis*; v.37, p.460-6, 2010.
- 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 CB, FRASSON AP, TASCA T. Trichomoniasis - are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide?. *Microb Cell*. v.3, n.9, p.404-419, 2016.
- MICHEL R.V., BORGES F.P., WILTUSCHNIG R.C., NEVES F.G., RIBEIRO J., VIEIRO R.C., *et al.* Prevalência da tricomonose em mulheres residentes na Vila dos Papeiros em Porto Alegre, RS. *Rev Bras Anal Clin*. v.38, p.127-30, 2006.
- MILLER, R.A.; BRITIGAN, B.E.; Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clinical Microbiology Reviews*, v.10, n.1, p.1-18, 1997.
- MILLS BB. Vaginitis: Beyond the Basics. *Obstet Gynecol Clin North Am*. v.44, n.2, p.159-177, 2017.
- MIN DY, HYUN KH, RYU JS, AHN MH, CHO MH. Degradations of human immunoglobulins and hemoglobin by a 60 kDa cysteine proteinase of *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol*. 1998;36(4):261-268. doi:10.3347/kjp.1998.36.4.261
- MIRANDA-OZUNA, J., RIVERA-RIVAS, L. A., CÁRDENAS-GUERRA, R. E., HERNÁNDEZ-GARCÍA, M. S., RODRÍGUEZ-CRUZ, S., GONZÁLEZ-ROBLES, A., CHAVEZ-MUNGUÍA, B., & ARROYO, R. Glucose-restriction increases *Trichomonas vaginalis* cellular damage towards HeLa cells and proteolytic activity of cysteine proteinases (CPs), such as TvCP2. *Parasitology*, v.146, n.9, p.1156–1166. 2019
- 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
- MOODLEY P, CONNOLLY C, STURM AW. Interrelationships among human immunodeficiency virus type 1 infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis, and the presence of yeasts. *J Infect Dis*.v.185, n.1, p.69-73, 2002.
- NOYES N, CHO KC, RAVEL J, FORNEY LJ, ABDO Z. Associations between sexual habits, menstrual hygiene practices, demographics and the vaginal microbiome as revealed by Bayesian network analysis. *PLoS One*.v.13, n.1, p.e0191625, 2018.
- NUGENT RP, KROHN MA, HILLIER SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol*. v.29, n.2, p.297-301, 1991.
- 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

- PANDEY, M., CHOUDHURY, H., ABDUL-AZIZ, A., BHATTAMISRA, S. K., GORAIN, B., CARINE, T., WEE TOONG, T., YI, N. J., & WIN YI, L., et al. Promising Drug Delivery Approaches to Treat Microbial Infections in the Vagina: A Recent Update. *Polymers (Basel)*. V.13, n.1, p.26, 2020.
- PATHAK, M., COOMBES, A., TURNER, M. S., PALMER, C., WANG, D., STEADMAN, K. J. Investigation of Polycaprolactone Matrices for Intravaginal Delivery of Doxycycline. *Journal of pharmaceutical sciences*, v.104, n.12, p.4217–4222, 2015.
- PEEBLES, K., VELLOZA, J., BALKUS, J. E., MCCLELLAND, R. S., & BARNABAS, R. V. High Global Burden and Costs of Bacterial Vaginosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sexually transmitted diseases*, v.46, n.5, p.304–311, 2019.
- PERIOLI, L., AMBROGI, V., VENEZIA, L., PAGANO, C., RICCI, M., ROSSI, C. Chitosan and a modified chitosan as agents to improve performances of mucoadhesive vaginal gels. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, v.66, n.1, p.141–145, 2008.
- 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.
- PROTO, W. R., COOMBS, G. H., MOTTRAM, J. C. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental?. *Nature reviews. Microbiology*, v.11, n.1, 58–66, 2013.
- PUENTE-RIVERA J, VILLALPANDO JL, VILLALOBOS-OSNAYA A, et al. The 50kDa metalloproteinase TvMP50 is a zinc-mediated *Trichomonas vaginalis* virulence factor. *Mol Biochem Parasitol*.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 JH, CHOI IW, YANG JB, et al. *Trichomonas vaginalis* metalloproteinase induces mTOR cleavage of SiHa cells. *Korean J Parasitol*.v.52, n.6, p.595-603, 2014.
- QUINTAS-GRANADOS, L.I. et al. TvMP50 is an immunogenic metalloproteinase during male trichomoniasis. *Molecular & Cellular Proteomics*, v.12, n.7, p.1953-1964, 2013.
- 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.
- RAWLINGS, N. D., WALLER, M., BARRETT, A. J., & BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research*, v.42(Database issue), p.D503–D509, 2014.

- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. *The Biochemical journal*, v. 290, n. Pt 1, p. 205–218. Feb. 1993.
- REDZA-DUTORDOIR, M., AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta*, v.1863, n.12, p.2977–2992, 2016.
- RIESTRA AM, GANDHI S, SWEREDOSKI MJ, *et al.* A *Trichomonas vaginalis* Rhomboid Protease and Its Substrate Modulate Parasite Attachment and Cytolysis of Host Cells. *PLoS Pathog.*v.11, n.12, p.:e1005294, 2015.
- RIGO, G V., PETRO-SILVEIRA, B., DEVEREUX, M., MCCANN, M., SANTOS, A. L.S., TASCA, T. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based metallodrugs and synergistic effect with metronidazole. *Parasitology*, 146(9), 1179–1183, 2018.
- RIGO, G. V., TASCA, T. Vaginitis: Review on Drug Resistance. *Current drug targets*, v.21, n.16, p.1672–1686, 2020.
- ROWLEY, J., VANDER HOORN, S., KORENROMP, E., LOW, N., UNEMO, M., ABU-RADDAD, L. J., CHICO, R. M., SMOLAK, A., NEWMAN, L., GOTTLIEB, S., THWIN, S. S., BROUTET, N., TAYLOR, M. M. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bulletin of the World Health Organization*. v.97, n.8, p.548–562P, .2019.
- SANTOS, A.L.; BRANQUINHA, M.H.; D'AVILA-LEVY, C.M. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.78, n.4, p.687-714, dez. 2006.
- SANTOS, O., RIGO, G. V., MACEDO, A. J., 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.
- SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., DALLA-COSTA, T., & GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, v.56, n.3, p.501–505, 2003a.
- SCHAFFAZICK, SCHEILA REZENDE *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova* [online]. v. 26, n. 5, pp. 726-737, 2003b.
- SCHELLENBERG, J.J., PATTERSON, M.H., HILL, J.E., Gardnerella vaginalis diversity and ecology in relation to vaginal symptoms. *Res. Microbiol.* v.168, n.837–844, 2017.
- SCHWEBKE JR, BURGESS D. Trichomoniasis. *Clin Microbiol Rev.*v.17, n.4, p.794-803, 2004.
- 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.

- 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.
- 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.
- SOBEL, J.D. Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* v.1, p.S148-153, 1992.
- SOBEL, J.D., FARO, S., FORCE, R.W., FOXMAN, B., LEDGER, W.J., NYIRJESY, P.R., REED, B.D., SUMMERS, P.R. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am. J. Obstet. Gynecol.*v.178, p.203-211, 1998.
- SOBEL, J.D., Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* v.214,p.15-21, 2016.
- SORIMACHI, H., HATA, S., ONO, Y. Calpain chronicle--an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, v.87, n.6, p.287–327, 2011.
- 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.
- SRINIVASAN S, MORGAN MT, FIEDLER TL, DJUKOVIC D, HOFFMAN NG, RAFTERY D, MARRAZZO JM, FREDRICKS DN. Metabolic signatures of bacterial vaginosis. *mBio*.v.6, n.2, p.e00204-15, 2015.
- 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. *Expehimental 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.

- TEIXEIRA, J.E. *et al.* Control of *Entamoeba histolytica* adherence involves metallosurface protease 1, an M8 family surface metalloprotease with homology to leishmanolysin. *Infection and Immunity*, v.80, n.6, p.2165-76, jun. 2012.
- THIRAWONG N, THONGBORISUTE J, TAKEUCHI H, SRIAMORNSAK P. Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin–liposome nanocomplexes. *J Control Release*.v.125, n.3, p.236–45, 2008.
- 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.
- VALENTA C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v.57, n.11, p.1692–1712, 2005.
- VALENTI, P., ROSA, L., CAPOBIANCO, D., LEPANTO, M. S., SCHIAVI, E., CUTONE, A., PAESANO, R., MASTROMARINO, P. Role of Lactobacilli and Lactoferrin in the Mucosal Cervicovaginal Defense. *Frontiers in immunology*, v.9, p.376, 2018
- VALKO M, MORRIS H, CRONIN MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* v.12, p.1161-208, 2005.
- VAN DE WIJGERT, J., JESPERS, V. The global health impact of vaginal dysbiosis. *Research in microbiology*, v.168, n.9-10, p.859–864, 2017.
- VAN GERWEN, O. T., & MUZNY, C. A. Recent advances in the epidemiology, diagnosis, and management of *Trichomonas vaginalis* infection. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-1666, 2019.
- VAN GERWEN, O. T., CRAIG-KUHN, M. C., JONES, A. T., SCHROEDER, J. A., DEEVER, J., BUEKENS, P., KISSINGER, P. J., MUZNY, C. A. Trichomoniasis and adverse birth outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 2021
- VANIĆ, Ž., ŠKALKO-BASNET, N. Nanopharmaceuticals for improved topical vaginal therapy: can they deliver?. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, v.50, n.1, p.29–41, 2013.
- VENNERI MA, FRANCESCHINI E, SCIARRA F, ROSATO E, D'ETTORRE G, LENZI A. Human genital tracts microbiota: dysbiosis crucial for infertility. *J Endocrinol Invest*. 2022.
- 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

VILLAMIL, S. H.F, VILCHEZ LARREA, S. C. Poly(ADP-ribose) metabolism in human parasitic protozoa. *Acta tropica*, v.208, p.105499, 2020.

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.

WEBER, J. I., RIGO, G. V., ROCHA, D. A., FORTES, I. S., SEIXAS, A., DE ANDRADE, S. F., TASCA, T. Modulation of peptidases by 2,4-diamine-quinazoline derivative induces cell death in the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, v.139, p.111611, 2021.

WIRINGA, A. E., NESS, R. B., DARVILLE, T., BEIGI, R. H., HAGGERTY, C. L. *Trichomonas vaginalis*, endometritis and sequelae among women with clinically suspected pelvic inflammatory disease. *Sexually transmitted infections*, v.96, n.6, p.436–438, 2020.

WORKOWSKI, K. A., BACHMANN, L. H., CHAN, P. A., JOHNSTON, C. M., MUZNY, C. A., PARK, I., RENO, H., ZENILMAN, J. M., & BOLAN, G. A. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. *MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports*, v.70, n.4, p.1–187, 2021.

WU, X., ZHANG, S., LI, H., SHEN, L., DONG, C., SUN, Y., CHEN, H., XU, B., ZHUANG, W., DEIGHTON, M., QU, Y. Biofilm Formation of *Candida albicans* Facilitates Fungal Infiltration and Persister Cell Formation in Vaginal Candidiasis. *Frontiers in microbiology*, v.11, p.1117, 2020.

YADAV M, DUBEY ML, GUPTA I, MALLA N. Cysteine proteinase 30 (CP30) and antibody response to CP30 in serum and vaginal washes of symptomatic and asymptomatic *Trichomonas vaginalis*-infected women. *Parasite Immunol.* v.29, n.7, p.359-365, 2007.

YANG Y, WEN YJ, CAI YN, *et al.* Serine proteases of parasitic helminths. *Korean J Parasitol.*v.53, n.1, p.1-11, 2015.

YANG, M. *et al.* Functional characterization of X-prolyl aminopeptidase from *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, v.143, n.11, p.1443-1449.

Yang, M., Li, L., Jiang, C., Qin, X., Zhou, M., Mao, X., & Xing, H. (2020). Co-infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3 among HPV16 positive female: a large population-based study. *BMC infectious diseases*, 20(1), 642. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05349-0>

YANG, M., LI, L., JIANG, C., QIN, X., ZHOU, M., MAO, X., XING, H. Co-infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3 among HPV16 positive female: a large population-based study. *BMC infectious diseases*, v.20, n.1, p.642, 2020.

YANO, J., SOBEL, J.D., NYIRJESY, P., SOBEL, R., WILLIAMS, V.L., YU, Q., NOVERR, M.C., FIDEL, P.L.J. Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. *BMC Womens Health*.v.19, p.48, 2019.

YAO, C., DONELSON, J. E., WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular and biochemical parasitology*, v.132, n.1, p.1–16, 2003.

ZARBO G, COCO L, LEANZA V, GENOVESE F, LEANZA G, D'AGATI A, et al. Aerobic vaginitis during pregnancy. *Res Obstet Gynecol* n.2, p.2, p.7–11, 2013;

ZIMMANN, N., RADA, P., ŽÁRSKÝ, V., SMUTNÁ, T., ZÁHONOVÁ, K., DACKS, J., HARANT, K., HRDÝ, I., & TACHEZY, J. Proteomic Analysis of *Trichomonas vaginalis* Phagolysosome, Lysosomal Targeting, and Unconventional Secretion of Cysteine Peptidases. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, v.21, n.1, p.100174. 2022

ZHAO, S., LIANG, Z., DEMKO, V., WILSON, R., JOHANSEN, W., OLSEN, O. A., SHALCHIAN-TABRIZI, K. Massive expansion of the calpain gene family in unicellular eukaryotes. *BMC evolutionary biology*, v.12, p.193, 2012.

ANEXOS

Anexo 1: Vaginitis: Review on Drug Resistance

O Anexo I é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 217 -231.

Rigo GV, Tasca T. Vaginitis: Review on Drug Resistance. Curr Drug Targets. 2020;21(16):1672-1686. doi:10.2174/1389450121666200804112340

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

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Sep 11, 2021

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	5146121477417
License date	Sep 11, 2021
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	fig

Anexo 3: Lista de artigos publicados na vigência do doutorado

- 1) SENGER, F. R. ; CAMPOS-SILVA, R. ; LANDELL, M. F. ; SILVA, D. B. ; MENEZES, C. B. ; **RIGO, G. V.** ; SILVA, L. N. ; TRENTIN, D. S. ; MACEDO, A. J. ; TASCA, T. . *Anti-Trichomonas vaginalis* activity and chemical analysis of metabolites produced by marine-associated fungi. PARASITOLOGY RESEARCH, 2022.
- 2) BRAZIL, NATHALYA TESCH ; MEDEIROS-NEVES, BRUNA ; FACHEL, FLÁVIA NATHIELY SILVEIRA ; PITTOL, VANESSA ; SCHUH, ROSELENA SILVESTRI ; **RIGO, GRAZIELA VARGAS** ; TASCA, TIANA ; VON POSER, GILSANE LINO ; TEIXEIRA, HELDER FERREIRA . Optimization of Coumarins Extraction from *Pterocaulon balansae* by Box-Behnken Design and *Anti-Trichomonas vaginalis* Activity. PLANTA MEDICA, v. 87, p. 480-488, 2021.
- 3) WEBER, JULIANA INÊS ; **RIGO, GRAZIELA VARGAS** ; ROCHA, DÉBORA ASSUMPÇÃO ; FORTES, ISADORA SERRAGLIO ; SEIXAS, ADRIANA ; DE ANDRADE, SAULO FERNANDES ; TASCA, TIANA . Modulation of peptidases by 2,4-diamine-quinazoline derivative induces cell death in the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY, v. 139, p. 111611, 2021.
- 4) NOCCHI, SAMARA REQUENA ; KATO, NATÁLIA NAOMI ; DE ALMEIDA, JULIO MENTA ; FERREIRA, ALDA MARIA TEIXEIRA ; TOFFOLI-KADRI, MÔNICA CRISTINA ; DE FREITAS MEIRELLES, LYVIA ELOIZA ; DAMKE, GABRIELLE MARCONI ZAGO FERREIRA ; CONSOLARO, MARCIA EDILAINE LOPES ; **RIGO, GRAZIELA VARGAS** ; MACEDO, ALEXANDRE JOSÉ ; TASCA, TIANA ; DOS REIS, SHARON VIEIRA ; ALVES, FLAVIO MACEDO ; CAROLLO, CARLOS ALEXANDRE ; SILVA, DENISE BRENTAN . Pharmacological properties of specioside from the stem bark of *Tabebuia aurea*. BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY, v. 30, p. 118-122, 2020.
- 5) SILVA, L.N. ; **RIGO, G.V.** ; SILVA, D.B. ; CAROLLO, C.A. ; TRENTIN, D.S. ; SILVA, M.V. ; TASCA, T. ; MACEDO, A.J. . Hydrolyzable tannins from *Poincianella* (*Caesalpinia*) *microphylla* fruits: metabolite profiling and *anti-Trichomonas vaginalis* activity. FOOD RESEARCH INTERNATIONAL, v. 134, p. 109236, 2020.

- 6) OSMARI, BÁRBARA FELIN ; GIULIANI, LAURA MINUSSI ; REOLON, JÉSSICA BRANDÃO ; **RIGO, GRAZIELA VARGAS** ; TASCA, TIANA ; CRUZ, LETÍCIA . Gellan gum-based hydrogel containing nanocapsules for vaginal indole-3-carbinol delivery in trichomoniasis treatment. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, v. 151, p. 105379, 2020.
- 7) PETRÓ-SILVEIRA, BRENDA; **RIGO, GRAZIELA VARGAS** ; DA SILVA TRENTIN, DANIELLE ; MACEDO, ALEXANDRE JOSÉ ; SAUER, ELISA ; DE OLIVEIRA ALVES, ELEN ; TALLINI, LUCIANA RUSCHEL ; GARCIA, SOLANGE CRISTINA ; DE SOUZA BORGES, WARLEY ; ZUANAZZI, JOSÉ ÂNGELO SILVEIRA ; TASCA, TIANA . *Trichomonas vaginalis* NTPDase inhibited by lycorine modulates the parasite-neutrophil interaction. PARASITOLOGY RESEARCH, v. 119, p. 2587-2595, 2020.
- 8) TREIN, MÁRCIA RODRIGUES; RODRIGUES E OLIVEIRA, LÍGIA; **RIGO, GRAZIELA VARGAS** ; GARCIA, MAYARA APARECIDA ROCHA ; PETRO-SILVEIRA, BRENDA ; DA SILVA TRENTIN, DANIELLE ; MACEDO, ALEXANDRE JOSÉ ; REGASINI, LUIS OCTÁVIO ; TASCA, TIANA . Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of chalcone and amino-analogues. PARASITOLOGY RESEARCH, v. 118, p. 607-615, 2019.