

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

**Atividade de peptídeos antimicrobianos contra protozoários patogênicos
cl clinicamente relevantes: busca por novos compostos para tricomoníase**

Corina Lobato Hagemann

Porto Alegre, junho de 2023.

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

**Atividade de peptídeos antimicrobianos contra protozoários patogênicos
cl clinicamente relevantes: busca por novos compostos para tricomoníase**

Dissertação apresentada
por **Corina Lobato
Hagemann** para obtenção
do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr. Tiana Tasca

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

PORTO ALEGRE, 2023

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30/07/2023, pela Banca Examinadora constituída por:

Dr. Flávia Roberta Brust

Pesquisadora do Health Security Partners (EUA)

Prof. Dr. Marilise Brittes Rott

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Hagemann, Corina
Atividade de peptídeos antimicrobianos contra
protozoários patogênicos clinicamente relevantes:
busca por novos compostos para tricomoníase / Corina
Hagemann. -- 2023.
188 f.
Orientadora: Tiana Tasca.

Coorientadora: Alexandre José Macedo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Trichomonas vaginalis. 2. Parasitologia. 3.
Peptídeos antimicrobianos. 4. Sinergismo. 5. Morte
celular. I. Tasca, Tiana, orient. II. Macedo,
Alexandre José, 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 no Grupo de Pesquisa em Tricomonas, Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, com financiamento do CNPq e FAPERGS. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Agradecimentos

Aos meus pais, Andre Hagemann e Marina Augusta Tavares Lobato Hagemann, pelo carinho, cuidado, apoio nas horas mais difíceis e incentivo incondicional aos meus estudos. Obrigada por serem minha base e porto seguro.

A minha irmã Emília Hagemann, pela paciência, amizade e amor. Obrigada por estar sempre junto comigo, disposta a me ouvir, ajudar e dar boas risadas.

Ao Guilherme Röhsig, pelo carinho e paciência. Obrigada pela parceria, ajuda em momentos difíceis e exaustivos, pelas aventuras ao redor do mundo, pelo apoio e cuidado. Obrigada por sempre torcer pela minha felicidade.

Aos meus colegas do GPTrico, por todos os momentos e cafés compartilhados e por tornarem a jornada mais leve. Agradeço especialmente a Ágata, Juju e Carol, tanto por serem meus braços esquerdo e direito quanto por todas as piadas e palhaçadas que faziam meus dias mais felizes e engraçados.

À minha orientadora, professora Tiana Tasca, pela disponibilidade, dedicação e paciência, mas principalmente pelo aprendizado passado para mim nesses últimos anos e pelo exemplo de profissional.

Aos meus amigos de escola, faculdade e demais pessoas que conheci durante essa jornada ou que de alguma forma fizeram parte do meu percurso, eu agradeço com todo meu coração. Com toda certeza vocês tiveram um papel determinante nesta etapa da minha vida!

RESUMO

A tricomoníase é a infecção sexualmente transmissível não-viral mais comum no mundo e seu agente etiológico é o protozoário *Trichomonas vaginalis*. Cerca de 70% dos indivíduos infectados pelo parasito são assintomáticos, o que a torna uma doença subdiagnosticada e de alta disseminação. Além disso, estudos já demonstraram correlação entre *T. vaginalis* e aumento do risco de câncer de colo do útero e de próstata, além da predisposição à aquisição e transmissão do vírus HIV. O tratamento é realizado utilizando fármacos da classe dos 5-nitroimidazóis, porém já foram reportados casos de resistência do parasito a esses medicamentos (2,5%-10%), o que torna a busca por novos compostos necessária. Peptídeos antimicrobianos são pequenas moléculas de proteína produzidas por diversos organismos, cuja função é proteger seu hospedeiro contra patógenos. Já foi demonstrado que a maioria possui mecanismo de ação em membranas celulares através de interações eletrostáticas, o que os torna moléculas com baixa probabilidade de gerarem resistência e, portanto, com potencial para o uso contra microrganismos. Baseado nisso, neste estudo fizemos uma triagem de 40 peptídeos sintéticos inspirados na natureza contra *T. vaginalis*. Três peptídeos, FB5, FB7 e FB8 mostraram atividade potente e seletiva contra o isolado da American Type Culture Collection (ATCC30236), com IC₅₀ de 0,65 uM, 1,5 uM e 0,6 uM, respectivamente. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* utilizando linhagem de células epiteliais vaginais humanas (HMVII) revelou baixo efeito citotóxico dos três peptídeos. Ainda, no teste de hemólise com eritrócitos humanos, os três peptídeos não foram hemolíticos. Os resultados mostraram o peptídeo FB5 como o mais promissor, portanto foi escolhido para os experimentos subsequentes e apresentou sinergismo com o metronidazol e secnidazol. FB5 não induziu a produção de espécies reativas de oxigênio nos trofozoítos, sugerindo que o mecanismo de ação não está relacionado a via REDOX. Resultados preliminares do ensaio de exposição à fosfatidilserina mostraram que o FB5 induziu necrose e apoptose tardia, o que requer uma investigação mais aprofundada usando microscopia eletrônica. Devido ao aumento crescente da resistência e às falhas terapêuticas no tratamento da tricomoníase, os resultados apresentam os peptídeos antimicrobianos como uma alternativa a ser investigada.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*, AMPs, peptídeos antimicrobianos, peptídeos sintéticos, sinergismo, morte celular.

Activity of antimicrobial peptides against clinically relevant pathogenic protozoa: search for new compounds for trichomoniasis

Trichomoniasis is the most common non-viral sexually transmitted infection in the world and its etiological agent is the protozoan *Trichomonas vaginalis*. About 70% of individuals infected by the parasite do not have symptoms, which makes it an underdiagnosed and highly disseminated disease. In addition, studies have already demonstrated a correlation between *T. vaginalis* and an increased risk of cervical and prostate cancer, in addition to a predisposition to acquiring and transmitting the HIV virus. Its treatment is carried out using drugs of the 5-nitroimidazole class, however, cases of parasite resistance to these drugs have already been reported (2.5%-10%), which makes the search for new compounds necessary. Antimicrobial peptides are small protein molecules produced by many organisms, whose function is to protect them host against pathogens. It has been shown that the majority have a mechanism of action on cell membranes through electrostatic interactions, which makes them molecules with a low probability of generating resistance and, therefore, with great potential for use against microorganisms. Based on that, in this study we screened 40 synthetic peptides inspired by nature against the protozoan *T. vaginalis*. Three molecules, FB5, FB7 and FB8 showed potent and selective activity against the American Type Culture Collection (ATCC30236) isolate, with IC₅₀ of 0.65 uM, 1.5 uM and 0.6 uM, respectively. The *in vitro* cytotoxicity assay using the human vaginal epithelial cells (HMVII) revealed low cytotoxic effect of three peptides. In addition, in the hemolysis test, the three peptides were not hemolytic. The results showed the FB5 peptide as the most promising, so it was chosen for subsequent experiments, where it showed synergism with metronidazole and secnidazole. Moreover, FB5 did not induce the production of reactive oxygen species by trophozoites, suggesting the mechanism of action not related to REDOX pathway. Preliminary results on phosphatidylserine exposition assay showed that FB5 induced necrosis and late apoptosis cell death types, which needs further investigation using electron microscopy. Due to the increasing resistance and the failures in the treatment of trichomoniasis, the results show antimicrobial peptides as an alternative to be further studied.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, AMPs, antimicrobial peptides, synthetic peptides, synergism, cell death.

Sumário

I. Introdução.....	11
II. Estado da arte.....	15
a. <i>Trichomonas vaginalis</i>	16
b. Tricomoníase	19
c. Mecanismos de patogenicidade.....	22
d. Tratamento.....	25
e. Resistência.....	26
f. Peptídeos antimicrobianos.....	28
III. Objetivos.....	33
IV. Capítulo I.....	35
V. Capítulo II.....	37
VI. Discussão Geral	39
VII. Conclusões.....	47
VIII.Perspectivas	49
IX. Referências Bibliográficas.....	51

I. Introdução

A tricomoníase é a infecção sexualmente transmissível (IST) não viral mais comum no mundo, causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis*. A maioria dos indivíduos (70-85%) infectados apresenta mínimos ou nenhum sintoma, o que facilita a transmissão e dificulta o controle da infecção (CDC, 2022). Os últimos dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que a incidência de tricomoníase é estimada em 156 milhões de casos em todo o mundo. No entanto, por não ser uma doença de notificação compulsória e devido às dificuldades de diagnóstico e tratamento este número é subestimado (VAN GERWEN *et al.* 2023; OMS, 2016). Além disso, a infecção por este parasito está altamente relacionada a uma maior facilidade na aquisição e transmissão do HIV/AIDS (SORVILLO *et al.*, 2001; MASON *et al.*, 2005; MCCLELLAND *et al.*, 2007; KISSINGER E ADAMSKI, 2013) e outras ISTs, aumento do risco de parto prematuro e baixo peso no neonato (COTCH *et al.*, 1997; SILVER *et al.*, 2014; DASKALAKIS *et al.*, 2023), doença inflamatória pélvica, infertilidade e câncer cervical e de próstata (VIIKKI *et al.*, 2000; SUTCLIFFE, 2010; ZHANG *et al.*, 2023).

Atualmente o único tratamento com eficácia clinicamente demonstrada para a tricomoníase são os fármacos da classe dos 5-nitroimidazóis, como metronidazol (MTZ), tinidazol (TNZ) e secnidazol (SNZ), sendo o MTZ a primeira escolha para homens e mulheres (CDC, 2022). É importante ressaltar que o tratamento deve ser realizado tanto pelo indivíduo infectado quanto pelos seus parceiros para garantir a erradicação do parasito. No entanto, a falta de adesão e o uso errado dos fármacos são responsáveis pelo aumento das taxas de reteste positivo entre indivíduos diagnosticados com tricomoníase, e, por consequência pelo aumento da resistência do parasito ao único tratamento disponível. A falha do tratamento pode variar de 7 a 10% e ainda mais entre as mulheres HIV positivo (KISSINGER *et al.*, 2015). Um estudo recente com isolados de *T. vaginalis* da África do Sul, em KwaZulu-Natal, revelou níveis de resistência de 11%, 2% e 1% para MTZ, TNZ e SNZ, respectivamente. Escores de resistência intermediária foram 28% para MTZ, 18% para TNZ, e 24% para SNZ (MTSHALI *et al.*, 2022). De fato, a verdadeira proporção é desconhecida e subestimada, pois a suscetibilidade ao MTZ de isolados de *T. vaginalis* é realizada apenas em laboratórios especializados principalmente para fins de

pesquisa. Neste contexto, a busca por novos compostos com atividade contra *T. vaginalis* é extremamente necessária.

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs), ou peptídeos de defesa do hospedeiro (PDH) são moléculas pequenas de proteína produzidas pelo sistema imune inato de diversos organismos como forma de proteção contra patógenos (HERNANDEZ-FLORES *et al.*, 2015). Diversos estudos na literatura já demonstraram que esses compostos possuem um amplo espectro e potencial terapêutico, possuindo atividade contra bactérias, fungos e vírus (BARR *et al.*, 1995). Além disso, os peptídeos antimicrobianos têm uma grande vantagem pois em sua maioria atuam em membranas biológicas com base na carga e na composição, rompendo as membranas das células não hospedeiras (GANZ & LEHRER, 1994; FIECK *et al.*, 2010). Portanto, é mais difícil que os microrganismos desenvolvam resistência a essas moléculas (BOPARAI & SHARMA, 2019), o que as torna de grande interesse como candidatos a fármacos para a tricomoníase.

II. Estado da arte

a. *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis é um protozoário parasito unicelular, flagelado e microaerofílico descoberto em 1836 pelo médico Alfred Donné (THORBURN AL, 1974). O parasito existe somente na forma de trofozoíto, cuja morfologia é piriforme, com 7-30 μm de comprimento e cinco flagelos, sendo quatro direcionados anteriormente e um posteriormente ao longo da membrana externa da membrana ondulante, responsável por sua motilidade característica (CDC, 2017). Além disso, o trofozoíto conta com um axóstilo, que consiste em dezenas de microtúbulos altamente organizados que ajudam no suporte e no processo de divisão células (BENCHIMOL, 2004). *T. vaginalis* é desprovido de mitocôndrias, possui os hidrogenossomos que contêm enzimas chaves que participam do metabolismo do piruvato no processo de glicólise, formação de hidrogênio molecular além de serem responsáveis pela produção de ATP e captação de cálcio, íon importante na via secretora do parasito.

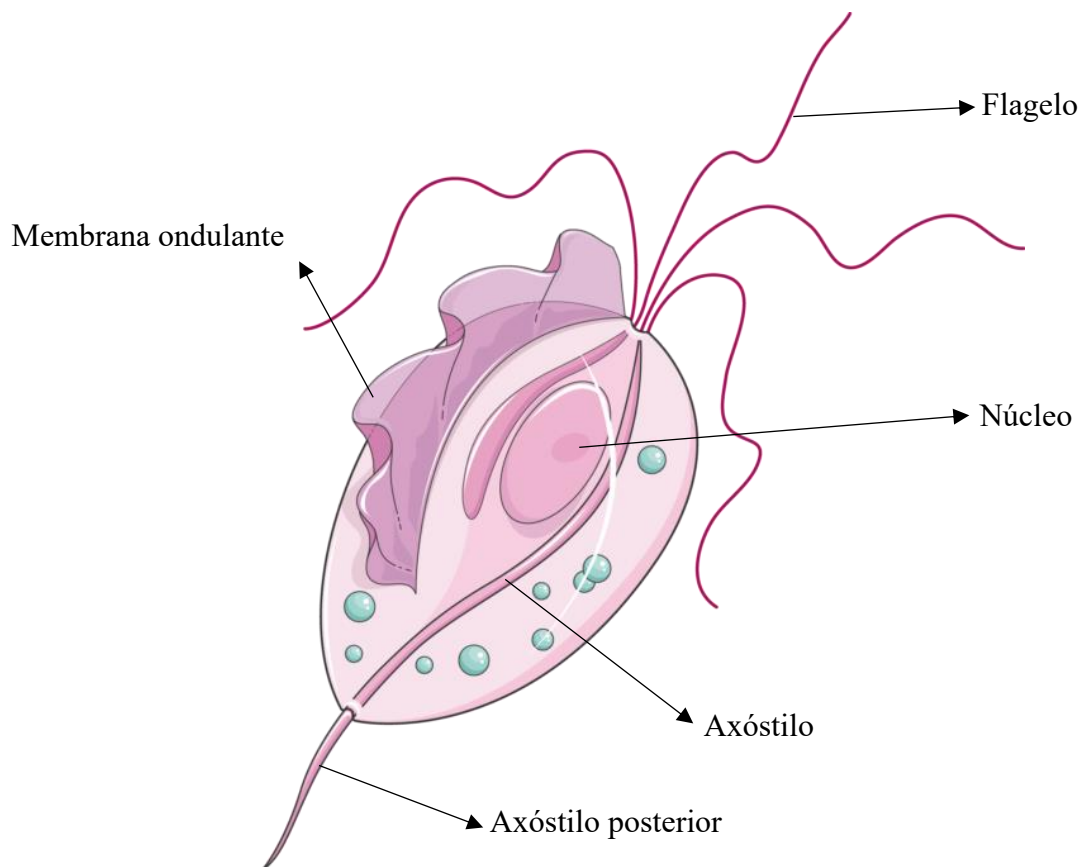


Figura 1: Características morfológicas de *T. vaginalis*. Adaptado de <https://smart.servier.com/>.

De acordo com a virulência do isolado, sua morfologia muda para ameboide ao ser exposta ao tecido do hospedeiro para assim aderir seletivamente às células epiteliais vaginais (CEVs) humanas, onde o parasito é capaz de sobreviver por anos (FICHOROVA *et al.*, 2009). Nestes casos, os trofozoítos emitem pseudópodes que permitem a citoaderência e a aquisição de nutrientes necessários para sua sobrevivência através da fagocitose de bactérias, fragmentos de CEVs, espermatozoides e hemácias (HONIGBERG e BRUGEROLLE, 1990). O parasito pode também formar pseudocistos ou formas endoflagelares ao ser submetido a baixas temperaturas ou a condições estressantes, apesar de seu ciclo de infecção não necessitar de um estágio de cisto, nesses casos serão vistos no microscópio com morfologia esférica e sem flagelos visíveis, pois eles são internalizados, o que dificulta sua identificação (KUSDIAN & GOULD, 2014; HIRT, 2013; PEREIRA-NEVES *et al.*, 2003).

O ciclo de vida de *T. vaginalis* é extremamente simples, uma vez que seu único hospedeiro é o ser humano e sua transmissão ocorre através de intercurso sexual. O parasito reside no trato genital feminino e uretra e próstata de homens. A fissão binária é a principal forma de divisão dos trofozoítos de *T. vaginalis*, mas o parasito também pode gerar formas multinucleadas que podem migrar ativamente nas células hospedeiras e das quais as células individuais podem brotar (KUSDIAN & GOULD, 2014).

É importante enfatizar que o sucesso da adesão dos parasitos nas células epiteliais dos hospedeiros depende de diversos fatores, uma vez que o ambiente que ele coloniza está sujeito a mudanças drásticas, como alteração de pH, microbiota, concentração de ferro de acordo com o ciclo menstrual feminino, temperatura e resposta imune do hospedeiro (FIGUEROA- ÂNGULO *et al.*, 2012). O parasito também possui uma microbiota própria, abrigando duas espécies de *Mycoplasma* e vírus, que podem contribuir para sua patogenia (FICHOROVA *et al.*, 2017). Ainda que seu mecanismo de infecção não tenha sido completamente elucidado, já são conhecidos mecanismos de virulência do protozoário para garantir sua permanência no hospedeiro e obtenção de nutrientes, incluindo a alteração em seu citoesqueleto, que permite que sua

morfologia passe de piriforme para ameboide ao entrar em contato com as células epiteliais vaginais (CEVs). *T. vaginalis* é um parasito obrigatório, pois não tem a capacidade para realizar síntese *de novo* de várias moléculas, particularmente purinas, pirimidinas e lipídios. Esses nutrientes são adquiridos das secreções vaginais ou por fagocitose de células hospedeiras e bacterianas (PETRIN *et al.*, 1998).

O metabolismo energético do *T. vaginalis* é baseado na degradação de carboidratos endógenos (glicogênio) e exógenos (predominantemente glicose), além de ser fermentativo, metabolizando-os no citoplasma e nos hidrogenossomos através de vias fermentativas que funcionam tanto sob condições anaeróbicas quanto aeróbicas (LINDMARK *et al.*, 1989). Entre os produtos deste metabolismo estão incluídos acetato, lactato, malato, glicerol, CO₂ e, sob condições anaeróbicas, H₂. Os carboidratos são a principal fonte de energia e, em condições em que este nutriente é limitado, o parasito sobrevive através do fornecimento de aminoácidos como arginina, treonina e leucina (PETRIN *et al.*, 1998). Originalmente, acreditava-se que o hidrogenossomo evoluiu de um endossimbionte bacteriano, mas agora se sabe que deriva de mitocôndrias e é responsável por parte do metabolismo energético do parasito. Apesar de sua aparente simplicidade, o hidrogenossomo é altamente eficaz e expressa certas proteínas, como a piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR), succinil-coA sintetase (SCS), enzima málica e hidrogenase para a quebra de piruvato e malato em dióxido de carbono e gás hidrogênio. Além disso, as vias para o catabolismo de aminoácidos também estão hospedadas nessa organela (LINDMARK *et al.*, 1989; PETRIN *et al.*, 1998; LEITSCH *et al.*, 2021).

Em relação ao seu metabolismo lipídico, o parasito necessita de colesterol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e esfingomiéline. O *T. vaginalis* no entanto é incapaz de biossintetizar ácidos graxos e colesterol a partir de precursores, porém é capaz de incorporar, mas não alterar a estrutura de ácidos graxos ou colesterol fornecidos de fontes exógenas como meio de cultura e em lipídios complexos (BEACH *et al.*, 1989). Além disso, o parasito necessita de adenina e guanina ou seus nucleosídeos, além de timidina, citidina, uracila e/ou uridina. No entanto, assim como para o metabolismo lipídico, é incapaz de realizar a síntese *de novo* desses nucleosídeos púricos e pirimídicos, portanto, deve recorrer a vias de recuperação. Neste caso a recuperação de purinas é

mediada por nucleosídeo fosforilases e quinases, enquanto as fosforibosiltransferases e nucleosídeos quinases são capazes de recuperar pirimidinas (PETRIN *et al.*, 1998). Outro fator essencial para seu crescimento, multiplicação e para a manutenção da infecção é a presença de ferro, uma vez que sua concentração está constantemente variando devido ao ciclo menstrual. Para isso, *T. vaginalis* conta com múltiplos sistemas de captação de ferro, como o receptor de 136 kDa para ligar o holo-Lf do hospedeiro e receptores para citocromo C, hemoglobina, heme e adesinas para eritrócitos e células epiteliais, que são as fontes de ferro (TORRES-ROMERO & ARROYO, 2009).

Sabe-se que a principal organela relacionada à morte por apoptose é a mitocôndria. No entanto, nos parasitos amitocondriados, como no caso do parasito *T. vaginalis*, a morte celular ocorre através de maneira não necrótica semelhante à apoptose, a forma mais frequente de morte celular programada (MCP). Estudos utilizando microscopia de epifluorescência revelaram várias formas de condensação da cromatina previamente descritas durante a MCP de organismos mitocondriais comuns à apoptose e à paraptose. A distensão da membrana celular e a partição final do conteúdo genômico em corpos apoptóticos também foram descritas em células de *T. vaginalis* (CHOSE *et al.*, 2003). Nesse contexto as proteases semelhantes a caspases são essenciais no processo de apoptose, uma vez que clivam proteínas alvos para iniciar o processo de morte celular através de vias altamente reguladas (PFEFFER e SINGH, 2018). No entanto, nenhuma das proteínas diretamente implicadas nas vias dependentes ou independentes de caspase foi descrita em *T. vaginalis*, o que sugere que exista uma via molecular diferente pela qual o parasito sofre MCP (CHOSE *et al.*, 2003). Neste sentido, nosso grupo já demonstrou compostos cujo mecanismo envolve a parada do ciclo celular do parasito e exibe um conjunto inédito de efeitos que falharam em preencher os critérios de apoptose e morte semelhante a apoptose já relatados em *T. vaginalis*, sugerindo algumas semelhanças com células paraptóticas, MCP descrita para organismos multicelulares (GIORDANI *et al.*, 2012; WEBER *et al.*, 2021; RIGO *et al.*, 2023).

b. Tricomoniase

Trichomonas vaginalis é o agente etiológico da tricomoníase, infecção sexualmente transmissível (IST) não viral mais comum no mundo, com incidência de 156 milhões de casos no mundo (VAN GERWEN *et al.*, 2023; OMS, 2016). Os humanos são o único hospedeiro natural do *T. vaginalis* e a transmissão ocorre de uma pessoa para outra por meio de relações sexuais. O período médio de incubação é de 5 a 28 dias, no entanto, a infecção pode persistir por períodos mais longos (TULCHINSKY *et al.*, 2014). Quatro pontos suportam a crença de que o *T. vaginalis* é transmitido sexualmente, sendo a evidência mais importante a alta taxa de infecção da uretra e/ou próstata em parceiros masculinos de mulheres infectadas. Nesses casos, a vaginite recorrente foi curada somente depois que os parasitos foram erradicados do trato genital desses pacientes. O segundo ponto é o fato de *T. vaginalis* ser observado mais frequentemente em mulheres que frequentam clínicas de doenças sexualmente transmissíveis (DST) e em prostitutas do que em mulheres pós-menopáusicas e virgens. Além disso, os trofozoítos morrem fora do corpo humano, a menos que sejam mantidos em meios líquidos. A transmissão não sexual foi observada em casos de duchas, espéculos ou assentos sanitários contaminados, através dos quais os tricomonas podem entrar na vagina, já que os trofozoítos de *T. vaginalis* vivos foram encontrados na urina e no sêmen após várias horas de exposição ao ar e na água da piscina. No entanto, tais casos são raros (PETRIN *et al.*, 1998).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) gera periodicamente estimativas para avaliar a carga global das quatro das infecções sexualmente transmissíveis curáveis mais comuns, dentre elas a tricomoníase. Os últimos dados fornecidos datam de 2016 e as estimativas de prevalência de tricomoníase foram de 5,3% e 0,6% em mulheres e homens, respectivamente (OMS, 2016; ROWLEY *et al.*, 2019). É importante enfatizar que apesar da alta incidência, a tricomoníase não é uma doença de notificação compulsória e também não está incluída em programas de controle de DSTs na maioria dos países, inclusive no Brasil, o que a torna uma infecção negligenciada e com um número subestimado de casos (OLIVEIRA *et al.*, 2016; AMBROZIO *et al.*, 2016). Além disso, outro desafio em estimar as taxas de infecção é a alta

proporção de infecções assintomáticas. Quando os sintomas ocorrem, eles são geralmente leves, manifestando-se como uma irritação geral e ou inchaço do trato urogenital e tecidos ao redor (PETRIN *et al.*, 1998). Em homens sintomáticos, a infecção está associada à uretrite, epididimite, infertilidade e função espermática reduzida (FICHOROVA, 2009).

A cronicidade da infecção está associada a um atraso no início do tratamento, com risco aumentado de desenvolver câncer do colo do útero (LAZENBY *et al.*, 2014) e câncer de próstata (HIRT e SHERRARD, 2015). A tricomoníase também é um fator de risco para doença inflamatória pélvica, parto prematuro, baixo peso do bebê ao nascer, complicações na gravidez e infertilidade (VAN DER POL *et al.*, 2008; SILVER *et al.*, 2014; KISSINGER, 2015). No entanto, a consequência mais crítica para os pacientes e para os serviços de saúde é a capacidade do parasito em facilitar para a transmissão e aquisição do HIV (SORVILLO *et al.*, 2001; VAN DER POL *et al.*, 2008, MAVEDZENGE *et al.*, 2010; THURMAN & DONCEL, 2011; KISSINGER e ADAMSKI, 2013). A infecção pelo *T. vaginalis* gera uma resposta imune local que causa a inflamação do epitélio e aumenta o recrutamento de células imunes alvo do HIV, que associados à micro hemorragia no epitélio permitem o aumento da carga viral na mucosa genital, aumentando conseqüentemente a exposição (KISSINGER e ADAMSKI, 2013).

O diagnóstico da tricomoníase costuma ser realizado microscopicamente pela visualização dos parasitos móveis em secreções uretrais, vaginais ou cervicais. Apesar de não ser o padrão-ouro, trata-se de um método simples, rápido e econômico, principalmente quando comparado com opções alternativas de diagnóstico, incluindo cultura ou métodos moleculares (BACHMANN *et al.*, 2011). No entanto, devido a sua baixa sensibilidade, uma vez que o parasito reduz sua motilidade quando fora do suas condições ideais, podendo ser confundido com células, como linfócitos, foi sugerido que qualquer serviço de diagnóstico que não possa garantir a capacidade de testar amostras dentro de uma hora após a aquisição deve usar métodos alternativos mais sensíveis (STONER *et al.*, 2013; GARBER, 2005). A cultura de *T. vaginalis* a partir de amostras clínicas costumava ser o padrão-ouro para o diagnóstico desse organismo, até 2015 (WORKOWSKI *et al.* 2015). Porém sua sensibilidade era de 70-85% e necessitava de sete dias de incubação para a

liberação de um laudo negativo. Atualmente o padrão-ouro são os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) (VAN GERWEN & MUZNY, 2019, WORKOWSKI *et al.* 2021).

c. Mecanismos de patogenicidade

Embora a patogênese do *T. vaginalis* não tenha sido completamente elucidada, sabe-se que a colonização bem-sucedida das membranas mucosas e a manutenção da infecção são provavelmente favorecidas por diversos mecanismos de virulência, como a ligação e degradação de componentes da mucosa e da matriz extracelular (MEC) e a adesão e citotoxicidade às VECs e células cervicais e prostáticas (MENEZES *et al.*, 2016). Além disso, estudos também relacionam a sua virulência com a sua microbiota própria, ou como são chamados, seus endossimbiontes: espécies de *Mycoplasma* e vírus denominados de *Trichomonasvirus* tipos 1 a 5 (TVV1-5) (MERCER & JOHNSON, 2018).

Por habitar um ambiente com muitas adversidades, o parasito precisa contar com diversos mecanismos para mediar o contato com as células epiteliais do hospedeiro evitando o ataque da resposta imune e para competir pelo espaço com a microbiota vaginal, para finalmente estabelecer a infecção. O sítio urogenital apresenta diversos fatores protetores que visam impedir a colonização por microrganismos patogênicos, portanto o parasito precisa ter uma grande capacidade de adaptação para sobreviver à hostilidade do ambiente, como pH ácido, temperatura, presença de microbiota vaginal composta por lactobacilos, alteração hormonal cíclica, nutrientes escassos, presença de metal zinco tóxico, flutuação de ferro e poliaminas necessárias para sua sobrevivência e remoção através do fluxo menstrual. Assim, o *T. vaginalis* produz diferentes fatores de virulência que permitem a aquisição de nutrientes necessários e sua sobrevivência na região (FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012; MENEZES *et al.*, 2016).

Devido a sua característica extracelular, o primeiro passo para se estabelecer no hospedeiro é a adesão no revestimento epitelial do trato

urogenital. O mecanismo de adesão às mucinas permite que os trofozoítos ganhem uma posição temporária antes da penetração na camada mucosa e no parasitismo final das células epiteliais subjacentes. Em seguida ocorre a citoaderência, um processo complexo que envolve as proteínas de superfície adesinas e glicoconjugados, além de proteínas do citoesqueleto, receptores para proteínas da MEC (laminina, fibronectina e colágeno) e processos de transdução de sinal e autofagia. Cinco proteínas de superfície do parasito foram caracterizadas como adesinas (AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23) e são reguladas positivamente na presença de ferro e durante a fixação às células epiteliais vaginais. Além disso as adesinas participam dos mecanismos de mimetismo molecular envolvidos na evasão imune e como receptores de hemoglobina (Hb) e Heme (HERNÁNDEZ *et al.*, 2014; FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012). Enquanto as adesinas estão concentradas no lado oposto à membrana ondulante, as proteínas de ligação à laminina são onipresentes em toda a superfície do *T. vaginalis* (CASTA E SILVA FILHO *et al.*, 1988). A laminina, uma glicoproteína localizada na membrana basal do epitélio, promove a adesão celular, diferenciação, forma e motilidade em células normais, e demonstrou ter propriedades quimiotáticas. Da mesma forma, *T. vaginalis* possui receptores para outra glicoproteína de adesão da matriz extracelular, a fibronectina, que é secretada tanto na membrana basal quanto no soro (PETRIN *et al.*, 1998). As cisteína proteinases (CPs) localizadas na superfície do parasito, como TvCP30 e TvCP62, lipoglicano (TvLG) e vários receptores de ECM também estão envolvidos na citoaderência. O lipoglicano de *T. vaginalis* (TvLG) é um importante fator de virulência que medeia a interação parasito-célula hospedeira por meio da ligação à galectina-1 humana. Como a transformação dos trofozoítos na forma ameboide é desencadeada após a ligação a VECs e MEC, a ligação do tipo TvLG à galectina-1 humana pode ser importante (FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012; MENEZES *et al.*, 2016).

A citotoxicidade do parasito às células do hospedeiro pode ocorrer de forma dependente de contato, que se inicia com a citoaderência do parasito seguida de efeito de citotoxicidade que envolve uma cascata de eventos resultando na citólise, fagocitose e desintegração das monocamadas celulares, ou por uma via independente de contato, que requer múltiplas moléculas envolvidas no dano celular, como efetores citolíticos (FIGUEROA-ÂNGULO *et*

al., 2012). Em relação aos seus simbiossitos, o *Trichomonasvirus* (TVV) é um vírus de RNA de cadeia dupla e pode ser classificado nos tipos I–IV. O parasito pode abrigar nenhum, um ou vários desses tipos. Sua presença nos trofozoítos pode aumentar a adesão às células hospedeiras e produção de citocinas inflamatórias a partir das células hospedeiras, de maneira dependente de TLR3, sugerindo que isso poderia aumentar a inflamação. O *Mycoplasma hominis* associado ao parasito aumenta a taxa de crescimento e produção de ATP do parasito e contribui para a inflamação. No entanto não está claro se as respostas imunes aumentadas causadas pela presença de *Mycoplasma hominis* em *T. vaginalis* promovem a eliminação do parasito ou contribuem para patologias associadas à inflamação (MERCER & JOHNSON, 2018; da LUZ *et al.*, 2015).

O *T. vaginalis* tem a habilidade de evadir a resposta imune do hospedeiro, principalmente por habitar um nicho onde há pouco sistema complemento presente. O sangue menstrual representa a única fonte de complemento disponível para a vagina e, curiosamente, sua atividade de complemento é cerca de metade da do sangue venoso. Cerca de um terço das amostras de sangue menstrual não têm nenhuma atividade de complemento (DEMES *et al.*, 1988). Além disso, o ferro aumenta a expressão de CPs que degradam imunoglobulinas e a porção C3 do complemento na superfície do organismo, permitindo que o parasito evite a destruição mediada pelo complemento (ALDERETE *et al.*, 1995; LEHKER & ALDERETE, 2000). Foram relatados dois imunógenos de superfície (P270 e P230) envolvidos na variação fenotípica do parasito. Para P230, a variação fenotípica é baseada em mudanças na acessibilidade do epítipo à ligação do anticorpo, embora a molécula esteja localizada na sua superfície o tempo todo. Já a expressão de superfície de P270 está relacionada à presença de um vírus dsRNA, concentração de ferro e fosforilação (FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012).

O mimetismo molecular também ocorre em *T. vaginalis* decorando a membrana do parasito com moléculas homólogas às proteínas do hospedeiro para evitar ser reconhecido como estranho pelo seu sistema imunológico. O protozoário é capaz de secretar proteínas solúveis altamente imunogênicas que neutralizam anticorpos e linfócitos T citotóxicos, além de induzir a apoptose de neutrófilos (LEHKER & ALDERETE, 2000; SONG *et al.*, 2008).

Outros mecanismos de patogenicidade são: fagocitose de diversas células e microrganismos, incluindo glóbulos vermelhos, leucócitos, células epiteliais vaginais, bactérias, leveduras e partículas virais (PEREIRA-NEVES & BENCHIMOL, 2007); hemólise para a obtenção de ferro a partir da hemoglobina (HERNÁNDEZ *et al.*, 2014); apoptose como forma de suprimir a resposta inflamatória ou imune no hospedeiro, favorecendo assim a sua sobrevivência e a infecção crônica (FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012; MENEZES *et al.*, 2016).

d. Tratamento

Atualmente o único tratamento da tricomoníase com eficácia clinicamente comprovada é realizado através da classe de fármacos 5-nitroimidazóis: metronidazol (MTZ), secnidazol (SNZ) e tinidazol (TNZ). Os três possuem idêntico mecanismo de ação, e apresentam uma série de efeitos colaterais que incluem sintomas do trato gastrointestinal, como náusea, anorexia, vômito e gosto metálico ou amargo na boca (LAMP *et al.*, 1999; ANDERSSON, 1981).

As recomendações de tratamento da tricomoníase para mulheres foram baseadas em uma meta-análise e um estudo randomizado multicêntrico de mulheres majoritariamente sintomáticas e sem infecção por HIV, que teve metronidazol 500 mg 2 vezes/dia por 7 dias como o regime mais adequado (HOWE & KISSINGER, 2017; KISSINGER *et al.*, 2010). O tinidazol possui melhor absorção e menos efeitos colaterais gastrointestinais quando comparado ao metronidazol, no entanto é consideravelmente mais caro (VAN GERWEN & MUNZY, 2019). O secnidazol é uma boa alternativa para pacientes com dificuldade na adesão do tratamento, uma vez que seu uso é de dose única, no entanto seu valor também é maior que o do metronidazol (MUZNY & VAN GERWEN, 2022, Muzny *et al.* 2021).

Para homens o tratamento recomendado pelo CDC é uma dose única (2g) de metronidazol. No entanto, não existem muitos dados na literatura e método ideal de tratamento em homens permanece pouco estudado, o que é um grande problema já que eles podem continuar a infectar parceira(s) sexual(is) feminina(s) sem saber (VAN GERWEN *et al.*, 2021). Por isso é

essencial que seja realizado o tratamento do indivíduo diagnosticado concomitante a todos os seus parceiros sexuais, além de serem aconselhados a se abster de relações sexuais até que todos tenham sido tratados e quaisquer sintomas tenham desaparecido (CDC, 2022).

Em relação a tricomoníase em mulheres gestantes, uma revisão da literatura não encontrou risco aumentado de teratogenicidade com o uso de MTZ (um fármaco de classe B) durante a gravidez, porém os outros fármacos da classe não foram avaliados (SHEEHY *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2017). Para mulheres com infecção por HIV e *T. vaginalis* o tratamento deve ser feito com metronidazol 500 mg via oral 2 vezes/dia por 7 dias (BALKUS *et al.*, 2013). No caso de mulheres grávidas e com infecção pelo HIV é necessário que o tratamento seja iniciado imediatamente, já que a infecção por *T. vaginalis* é um fator de risco para transmissão vertical do HIV (GUMBO *et al.*, 2010; PRICE *et al.*, 2018).

e. Resistência

Desenvolvido em 1959, o MTZ foi aprovado para o tratamento da tricomoníase no início da década de 1960 e foi o primeiro medicamento a ter taxa de cura próxima a 100% com tratamento sistêmico (COSAR & JULOU, 1959). No entanto, já em 1962 começaram os primeiros relatos de resistência do parasito a este fármaco (ROBINSON, 1962). O grupo 5-nitro, quando reduzido a um radical nitro dentro do parasito *T. vaginalis*, é responsável pela atividade antiprotozoária (CUDMORE *et al.*, 2004). A resistência de *T. vaginalis* ao metronidazol é classificada como aeróbica ou anaeróbica. Na resistência aeróbica, vias de eliminação de oxigênio e possivelmente ferredoxina estão envolvidas. Essas vias não estão implicadas na resistência anaeróbica, que é impulsionada por uma redução ou cessação da atividade de PFOR e hidrogenase (CUDMORE *et al.*, 2004).

A resistência aeróbica surge devido a deficiências associadas aos mecanismos de eliminação de oxigênio da via de defesa antioxidante (ELLIS *et al.*, 1994). Embora os níveis aumentados de O₂ e MTZ inativem as vias

metabólicas citosólicas, as vias metabólicas hidrogenossomais ainda são funcionais em isolados de *T. vaginalis* resistentes aeróbios. Isso é caracterizado por taxas aumentadas de consumo de glicose e produção aumentada de acetato e CO₂ (ELLIS *et al.*, 1992). Já a resistência anaeróbica tem sido observada principalmente *in vitro* e induzida em condições de laboratório, em vez de surgir clinicamente (GRAVES *et al.*, 2020) e se caracteriza pela interrupção de enzimas que participam da via de produção de energia, como a PFOR, NADH:FOR, Fdx. (LAND *et al.*, 2001; RASOLOSÓN *et al.* 2002). No entanto, a resistência total ocorre apenas quando as atividades de PFOR e NADH:FOR são perdidas (GRAVES *et al.*, 2020). Outra via alternativa de energia proposta em cepas resistentes de *T. vaginalis* contorna o PFOR e a necessidade de passar elétrons para Fdx e envolve a enzima cetoácido oxidorreductase (KOR), que, como o PFOR, pode reduzir o piruvato e outros metabólitos para atender às demandas de energia do *T. vaginalis* (BROWN *et al.*, 1999). Até o momento, os mecanismos exatos da resistência ao metronidazol em *T. vaginalis* não são totalmente conhecidos e pouco se sabe sobre sua base molecular (KISSINGER, 2015). No entanto, acredita-se que pode ser devido a várias mutações em alvos selecionados (PAULISH-MILLER *et al.*, 2014, BRADIC *et al.*, 2017).

O mecanismo de resistência ao metronidazol em *T. vaginalis* decorrente de falhas no tratamento não é bem compreendido (resistência aeróbica), ao contrário da resistência induzida em laboratório sob pressão crescente de metronidazol (resistência anaeróbica). No último caso, a função hidrogenossômica que está envolvida na ativação do pró-fármaco, metronidazol, é regulada negativamente. A reversão à sensibilidade é incompleta após a remoção da pressão do fármaco nos parasitos altamente resistentes, enquanto os isolados clinicamente resistentes, até então analisados, mantêm seus níveis de resistência na ausência da pressão do fármaco. Embora a resistência anaeróbica tenha sido considerada um fenômeno induzido em laboratório, ela foi claramente demonstrada em isolados clínicos (DUNNE *et al.*, 2003).

f. Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (AMPs), também chamados de peptídeos de defesa do hospedeiro (HDPs), são um grupo diversificado de proteínas divididas em muitos subgrupos com base em sua composição, estrutura de aminoácidos e outras propriedades. Essas moléculas representam um antigo mecanismo de defesa do hospedeiro e servem como um sistema de defesa de primeira linha que está presente constitutivamente, mas pode ser aumentado com inflamação e lesão (YEAMAN & YOUNT, 2003; BOPARAI & SHARMA, 2020; IZADPANAH & GALLO, 2005). A descoberta dos peptídeos ocorreu em 1939, quando Dubos extraiu um agente antimicrobiano de uma cepa de *Bacillus* do solo (DUBOS, 1939). Desde então, os AMPs foram detectados em todos os organismos vivos multicelulares; além disso, foram descritos os efeitos biológicos e as composições de aminoácidos de várias centenas de AMPs (KYOUNG KANG *et al.*, 2017). Além de suas propriedades antimicrobianas, desempenham um papel central em processos intracelulares, como angiogênese, respostas inflamatórias, sinalização celular e respostas de cicatrização de feridas, o que os torna candidatos interessantes na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (ZAIYOU, 2007).

A composição de aminoácidos e o comprimento dos AMPs estudados são extremamente diversos e eles possuem diversas características estruturais, que são essenciais para sua atividade (KYOUNG KANG *et al.*, 2017). Com base em sua carga líquida, os AMPs podem ser categorizados como catiônicos ou aniônicos (DEO *et al.*, 2022). Em sua maioria são oligopeptídeos de 5 a 100 aminoácidos com uma carga líquida positiva (tipicamente +2 a +11) e uma proporção significativa (tipicamente 50%) de resíduos hidrofóbicos (BIN HAFEEZ *et al.*, 2021). Suas estruturas secundárias podem ter quatro arquiteturas que incluem: α helicoidal, fita β devido à presença de duas ou mais ligações dissulfeto, β -hairpin ou loop devido à presença de uma única ligação dissulfeto e/ou ciclização da cadeia peptídica, e por último, estendida (BOPARAI & SHARMA, 2020). No entanto, alguns autores acreditam que muitos peptídeos antimicrobianos existam em conformações relativamente não estruturadas ou estendidas antes da interação com as células-alvo,

enquanto outros são mantidos em conformações específicas por ligações intramoleculares (YEAMAN & YOUNT, 2003).

Peptídeos antimicrobianos empregam mecanismos de ação sofisticados e dinâmicos para efetuar atividades rápidas e potentes consistentes com seus prováveis papéis na defesa antimicrobiana do hospedeiro, como por exemplo: 1. desestabilização da membrana microbiana, 2. Efeito em alvos intracelulares (LE *et al.*, 2017), e 3. modulação imune (KYOUNG KANG *et al.*, 2017). No entanto, distinções bioquímicas entre os próprios peptídeos, células-alvo versus células hospedeiras e os microambientes nos quais essas contrapartes se reúnem provavelmente fornecem graus variados de toxicidade seletiva entre diversos tipos de peptídeos antimicrobianos (YEAMAN & YOUNT, 2003).

Peptídeos que tem como alvo membranas celulares agem por meio de interações eletrostáticas iniciais entre moléculas peptídicas carregadas positivamente e a superfície celular carregada negativamente, seguidas por interações hidrofóbicas entre o domínio anfipático do peptídeo e os fosfolipídios da membrana. Os mecanismos pelos quais os AMPs podem atravessar as membranas microbianas não são comuns a todos os peptídeos e parecem depender das propriedades moleculares de ambos, características do peptídeo e composição lipídica da membrana (HOLLMANN *et al.*, 2018). Portanto, os AMPs são subcategorizados em dois tipos com base em seus mecanismos de ação: destruidores de membrana e peptídeos não direcionados à membrana (COOPER & WILLIAMS, 1999).

Os mecanismos de ação propostos para a subsequente formação de poros são os modelos “barril-stave”, tipo tapete, poro toroidal e agrupamento de lipídios aniônicos, sendo que alguns AMPs atuam por meio de mais de um mecanismo (HAFEEZ *et al.*, 2021). O mecanismo “barril-stave” envolve três etapas. Na primeira etapa, os monômeros dissolvidos na solução se ligam de forma relativamente rápida à membrana. Em seguida, esses monômeros se inserem na bicamada lipídica. Finalmente, na última etapa, os monômeros se agregam em uma formação semelhante a um barril, na qual é formado um poro aquoso central cercado por proteínas. Este poro aumenta de diâmetro através do recrutamento progressivo de monômeros adicionais (RAPAPORT & SHAI, 1991). O mecanismo do poro toroidal é semelhante ao modelo “barril-stave”, mas difere no fato de que os peptídeos estão alinhados com os grupos de

cabeças lipídicas, mesmo quando inseridos perpendicularmente na bicamada lipídica, os poros formados são transitórios e as estruturas formadas são menos estáveis (LEONTIADOU *et al.*, 2006). No modelo de tapete os peptídeos se ligam à superfície da membrana fosfolipídica até que uma concentração limite seja alcançada e, em seguida, a permeiam de maneira semelhante a um detergente. À medida que os peptídeos cobrem a superfície celular, buracos transitórios são formados. Em contraste com o mecanismo “barril-stave”, o mecanismo do tapete não requer uma estrutura peptídica específica, nem a formação de canais estruturados (POUNY *et al.*, 1992; TRIPATHI *et al.*, 2022). A atividade de agrupamento de lipídios aniônicos envolve a interação preferencial de AMPs catiônicos com lipídios carregados aniônicos, causando a segregação lateral desses lipídios dos zwitteriônicos, resultando na formação de defeitos de limite de fase entre os domínios lipídicos (SENGUPTA *et al.*, 2008). Apesar de todas as evidências relatadas, o mecanismo de ação e rompimento das membranas não é totalmente compreendido (BOPARAI & SHARMA, 2020).

Alguns AMPs podem matar os microrganismos sem afetar a estabilidade da membrana. Esses peptídeos penetram diretamente nas células e interferem nas atividades celulares essenciais, incluindo replicação do DNA, transcrição, tradução, dobramento de proteínas e divisão celular (PARK *et al.*, 1998). A inibição das vias intracelulares devido à captação celular de AMPs pode ocorrer por diferentes mecanismos, incluindo penetração direta e endocitose (NICOLAS, 2009). A membrana celular se dobra para dentro e forma vesículas que se assemelham a pequenas células cercadas por uma membrana. Uma porção dessa membrana é revestida com proteínas caveolina ou clatrina, que subsequentemente levam à formação de cavidades. Por fim, as depressões formadas brotam da membrana em direção ao interior da célula e formam vesículas (MAYOR & PAGANO, 2007). Além desses efeitos antimicrobianos diretos, recentemente foi demonstrado que os AMPs funcionam na modulação imune do hospedeiro, muitas vezes aumentando a imunidade protetora e suprimindo a inflamação (HANCOCK *et al.*, 2012).

Os AMPs estão atualmente sendo explorados como terapias alternativas, já que muitos microrganismos estão se tornando resistentes aos fármacos atualmente usados, como é o caso da tricomoníase. Muitos desses

AMPs demonstram ação antimicrobiana ao direcionar múltiplos alvos e caminhos. A prevalência de peptídeos naturais em diversas espécies indica claramente a sua capacidade de inativar diversas espécies bacterianas em vários bioambientes. A rápida ação dos AMPs e seus mecanismos de ação contra micróbios suscetíveis podem não permitir tempo suficiente para desenvolver resistência, tornando-os melhores alternativas aos antibióticos. O potencial dos AMPs para aumentar a eficiência de matar e controlar infecções resistentes a medicamentos exige mais atenção e pesquisa para abordar seu baixo rendimento e estabilidade. Apesar das múltiplas abordagens que podem ser usadas para a produção de AMP, não existe hoje nenhum método padronizado que forneça de forma confiável os altos rendimentos necessários. Mais pesquisas são necessárias para melhorar a produção para um rápido avanço em estudos clínicos e comercialização (DEO *et al.*, 2022). Assim, estudos futuros sobre AMPs devem se concentrar em elucidar os determinantes estruturais críticos e os mecanismos de atividade dos AMPs naturais e a aplicação dessas relações estrutura-função ao design racional de AMPs sintéticos para otimizar a atividade antimicrobiana e minimizar a toxicidade e os custos de produção (STECKBECK *et al.*, 2014).

III. Objetivos

Objetivo geral

O objetivo geral desta dissertação foi avaliar elaborar um artigo de revisão demonstrando peptídeos antimicrobianos que apresentaram atividade contra protozoários patogênicos e caracterizar a atividade *in vitro* anti-*T. vaginalis* de peptídeos sintéticos inspirados na natureza, visando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tratamento da tricomoníase.

Objetivos específicos

1. Avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* de peptídeos sintéticos;
2. Avaliar o efeito dos peptídeos ativos na proliferação do parasito;
3. Investigar a citotoxicidade dos peptídeos frente às linhagens celulares de células epiteliais vaginais e eritrócitos humanos;
4. Testar a associação do peptídeo mais ativo com metronidazol e secnidazol;
5. Avaliar o efeito do peptídeo mais ativo na produção de espécies reativas de oxigênio pelo parasito;
6. Avaliar o tipo de morte celular e as alterações morfológicas produzidas pelo peptídeo mais ativo nos trofozoítos.

O texto completo do capítulo I, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 38-144, foi suprimido por tratar-se de um manuscrito submetido para publicação em periódico científico. Consiste em uma revisão da literatura demonstrando os peptídeos antimicrobianos com atividade frente a protozoários clinicamente relevantes, como amebíase, giardíase, tricomoníase, doença de Chagas, leishmaniose, malária e toxoplasmose. A busca nas bases de dados foi realizada utilizando termos como “antimicrobial peptides,” “peptides,” “AMPs,” “parasitocidal,” “antiparasitic,” “antiprotozoal,” “amebiasis,” “amoebicidal,” “Entamoeba histolytica,” “giardiasis,” “giardicidal,” “Giardia duodenalis,” “trichomoniasis,” “Trichomonas vaginalis,” “Chagas disease,” “antichagasic,” “trypanocidal,” “Trypanosoma cruzi,” “Leishmaniasis,” “Leishmanicidal,” “Leishmania spp.,” “malaria,” “anti-plasmodial,” “Plasmodium,” “toxoplasmosis,” e “Toxoplasma gondii” na base de dados PubMed. Como critérios de seleção, apenas artigos que descrevem o peptídeo antimicrobiano com atividade antiprotozoária e em inglês foram incorporados nesta revisão. Não houve filtros por data de publicação ou tipo de publicação, exceto para doença de Chagas, malária e leishmaniose (estudos publicados desde 2010 até agora). Além disso, compilamos dados sobre tipo de peptídeo, sequência, fonte, concentrações de ativos, e mecanismo de ação em sete tabelas.

*O texto completo do capítulo II, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 146-172, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição da investigação da atividade de peptídeos sintéticos frente a *T. vaginalis*, bem como o efeito dos compostos mais ativos nos trofozoítos, avaliação de toxicidade *in vitro* e *in vivo*, e possível efeito na resposta de células vaginais. Os resultados demonstraram que os compostos mais ativos foram o FB5, FB7 e FB8 com valores de IC50 de 0,65, 1,5 e 0,6 μM , respectivamente. Os compostos ativos não apresentaram citotoxicidade frente a células epiteliais vaginais humanas ou atividade hemolítica frente a eritrócitos humanos. O tratamento dos trofozoítos de *T. vaginalis* com os compostos não induziu acúmulo de espécies reativas de oxigênio.*

VI. Discussão Geral

Após a inserção do MTZ como tratamento da tricomoníase em 1962, apenas três anos foram necessários para observar relatos de falha terapêutica devidos à resistência. Além disso, a inexistência de surtos de resistência corrobora para a hipótese de tolerância natural em *T. vaginalis* a estes fármacos (CONRAD *et al.*, 2012). No final dos anos 90, foi relatado um aumento acentuado de falhas no tratamento de infecções por *T. vaginalis* com metronidazol, representando um problema devido às opções limitadas de tratamento (MARQUES-SILVA *et al.*, 2021).

Além de amplamente distribuída pelo mundo, a tricomoníase foi classificada pelo CDC/EUA como doença parasitária negligenciada, ou seja, infecção considerada endêmica em populações de baixa renda, e apresenta indicadores reduzidos de investimentos em pesquisa, produção de medicamentos e controle (SECOR *et al.*, 2014). A incidência de resistência a medicamentos em *T. vaginalis* parece estar aumentando e é necessária uma melhor vigilância das falhas do tratamento. Medicamentos e tratamentos alternativos foram testados *in vivo* em casos de tricomoníase refratária, bem como *in vitro* com alguns sucessos, porém nenhum fármaco com novo mecanismo de ação foi aprovado, o que é altamente problemático (RIGO *et al.*, 2022).

Embora o foco tradicional dos programas de descoberta de antibióticos em grandes empresas farmacêuticas (e em outros lugares) tenha sido centrado na terapêutica de pequenas moléculas, uma nova classe de moléculas foi proposta como uma fonte potencial de novos anti-infecciosos (ZASLOFF, 2002). Dada a resistência cada vez maior de vários patógenos às terapias antimicrobianas existentes, os AMPs recentemente atraíram grande interesse como potenciais agentes terapêuticos (HAFEEZ *et al.*, 2021). Algumas características desejáveis para os AMPs são: ação rápida e ampla à qual o patógeno terá dificuldade em desenvolver resistência, alta especificidade e, o mais importante, originadas de diversas fontes, como bactérias; animais invertebrados e vertebrados, bem como plantas. Além disso, os AMPs também são capazes de modular a resposta imune (NOGRADO *et al.*, 2022).

Considerando a busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da tricomoníase e o crescente interesse nos AMPs como uma classe potencial de antimicrobianos, capaz de aumentar a imunidade, restaurar a

potência ou amplificar os mecanismos dos antibióticos convencionais e minimizar os mecanismos de resistência antimicrobiana entre patógenos, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade de peptídeos sintéticos contra o protozoário *Trichomonas vaginalis* e investigar seu potencial mecanismo de ação no parasito.

Sendo assim, o Capítulo I dessa dissertação teve como objetivo fazer uma revisão da literatura com todos os peptídeos antimicrobianos testados contra os seguintes protozoários: *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Leishmania spp.*, *Plasmodium spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* e *Trichomonas vaginalis*. Como critérios de seleção, foram incorporados na revisão apenas artigos que descrevessem o AMP, demonstrando atividade antiprotozoária e no idioma inglês, sem filtro de data de publicação ou tipo de publicação, exceto para doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), malária (*Plasmodium spp.*) e leishmaniose (*Leishmania spp.*) (estudos publicados de 2010 até o momento). Esta revisão atualizou os principais achados sobre AMPs contra protozoários clinicamente relevantes e demonstrou que os peptídeos antimicrobianos apresentam características favoráveis que os elegem como uma classe potencial de compostos bioativos a serem pesquisados contra parasitos humanos. Além disso foram comparadas as sequências de aminoácidos dos peptídeos ativos dos estudos, no entanto as tentativas de alinhamentos para descobrir as posições conservadas desses aminoácidos não alcançaram nenhuma convergência, nem comparando todos os parasitos, nem comparando em um único parasito. Isto podem indicar que existe uma grande diversidade de alvos o que também acarreta desafios no desenvolvimento de novas moléculas contra esses parasitos.

O segundo capítulo desta dissertação teve como objetivo a avaliação da atividade anti-*T. vaginalis* de quarenta peptídeos sintéticos, dos quais três (FB5, FB7 e FB8) apresentaram atividades promissoras, inibindo o crescimento dos trofozoítos após 24 horas de incubação com concentração inibitória mínima (MIC) < 50 μM e IC_{50} de 0,65, 1,5 e 0,6 μM , respectivamente, sendo todos estes valores inferiores aos obtidos para o atual fármaco de escolha para o tratamento, MTZ ($\text{IC}_{50} = 1,64 \mu\text{M}$). A influência desses três peptídeos no crescimento dos trofozoítos de *T. vaginalis* também foi corroborada pelo ensaio cinético com os respectivos valores de MIC, como observado na Figura 2 do

segundo capítulo, apenas 2 horas são necessárias para total inibição do crescimento no valor de MIC. Este tempo de 2 horas foi utilizado para a incubação dos seguintes experimentos realizados no capítulo II.

Devido ao mecanismo de ação de desestabilização de membranas da maioria dos peptídeos antimicrobianos, muitos deles apresentam citotoxicidade às células mamíferas. A atividade antimicrobiana seletiva resulta de um delicado equilíbrio entre interações hidrofóbicas e eletrostáticas tridimensionais entre um peptídeo antimicrobiano e seu alvo (DATHE *et al.*, 1996). A citotoxicidade do FB5, FB7 e FB8 foi testada utilizando a linhagem celular HMVII, constituída por células de melanoma maligno de epitélio vaginal, e em seguida foi realizado o cálculo de índice de seletividade (IS). Este cálculo é feito através da razão entre o CC_{50} e o IC_{50} do composto, ou seja, compara o potencial citotóxico e o potencial parasiticida, indicando se toxicidade é seletiva para o agente infeccioso ou não. Os peptídeos apresentaram IS de 35, 7 e 16 para FB5, FB7 e FB8, respectivamente. Ainda não há consenso acerca do que é considerado o valor ideal de IS, no entanto seguindo a definição de que para uma molécula ser considerada seletiva, o IS deve ser maior do que 5,0 (GROGL *et al.*, 2013), nenhum dos três peptídeos apresentou citotoxicidade contra esta linhagem de células epiteliais vaginais, um resultado bastante promissor. O FB5 foi o peptídeo que apresentou o maior índice, com valor de IS superiores a 10 e, de acordo com Nava-Zuazo *et al.* (2010), apresenta eficácia biológica, com potente e seletiva atividade antiparasitária, e assim, deve ser submetido a estudos *in vivo*. Além disso, foi realizado o ensaio de hemólise, onde eritrócitos humanos de doadores saudáveis foram incubados durante 24h com os peptídeos partindo da concentração de 50 μ M, e todos apresentaram menos de 15% de liberação de hemoglobina quando comparado com o controle positivo. Devido a esses resultados e à limitação de peptídeos para os ensaios subsequentes, o FB5 foi selecionado para os demais experimentos deste estudo.

Outro aspecto investigado neste trabalho foi a possível associação entre o FB5, o peptídeo mais promissor, e os fármacos MTZ e SNZ frente ao isolado Tv-LACM15, escolhido para este ensaio pela ausência de endossimbiontes, *Mycoplasma hominis* e *Trichomonasvirus*. Assim, além da notável atividade do peptídeo FB5 o estudo demonstrou uma associação sinérgica entre FB5 e MTZ,

bem como FB5 e SNZ. Esse resultado indica que FB5 e os dois fármacos testados agem por via diferente da que já é conhecida por apresentar resistência, e o efeito sinérgico permite que doses mais baixas possam ser administradas para obter o efeito desejado (MOHHAMADI-BERENJESTANAKI *et al.*, 2019). A possibilidade de diminuir as doses dos fármacos 5-nitroimidazóis permite uma diminuição nos seus efeitos adversos, além disso, devido às limitadas opções de tratamento para a tricomoníase, o uso combinado de compostos é uma estratégia útil em um cenário de escassez de terapias aprovadas (HÜBNER *et al.*, 2016). Outros estudos também demonstraram resultados de sinergismo na atividade anti-*T. vaginalis* na combinação de compostos com MTZ, como pode ser observado para tritripticina (um peptídeo antimicrobiano de 13 resíduos de amino ácidos) e o composto metálico derivado de 1,10-fenantrolina-5,6-diona (INFANTE *et al.*, 2011; RIGO *et al.*, 2018).

Passou-se então para a investigação dos mecanismos de ação pelo qual o FB5 leva o parasito à morte. É interessante que o mecanismo de novos compostos testados seja diferente do mecanismo dos fármacos da classe dos 5-nitroimidazóis atualmente aceitos para a terapia, pois um mecanismo semelhante poderia gerar uma resistência cruzada e o novo composto seria rapidamente descartado. Como foi visto na literatura, o principal mecanismo de ação dos peptídeos é ligação às membranas celulares com base na carga e na composição, portanto, a maioria rompe as membranas das células não hospedeiras, causando estresse na bicamada lipídica que, por fim, leva à lise da parede celular e à morte (FIECK *et al.*, 2010). Para isso foi realizada a verificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelos trofozoítos de *T. vaginalis*, quando tratados com o FB5, além da investigação do mecanismo de morte gerado, necrose, apoptose ou apoptose tardia.

A análise da indução da produção de espécies reativas de oxigênio por trofozoítos previamente tratados foi realizada e não houve efeito significativo, indicando que este mecanismo não está envolvido na morte do parasito. Este resultado é muito promissor, uma vez que a via redox é o mecanismo de ação dos fármacos já utilizados e apresenta fenômeno de resistência (DUNNE *et al.*, 2003).

Seguindo esta investigação foi realizado o ensaio de Anexina V-FITC (verde fluorescente) que se liga à fosfatidilserina exposta na membrana plasmática e o iodeto de propídio que detecta células mortas (vermelho fluorescente). As células apoptóticas mostram fluorescência verde, as células mortas mostram vermelha, e as células vivas não mostram fluorescência detectada pela citometria de fluxo. Desta forma, o isolado ATCC 30236 exposto ao FB5 apresentou principalmente tipos de morte celular necrótica e apoptótica tardia, com menor número de trofozoítos em apoptose precoce. Estudos realizados em bactérias indicam que a principal ação dos AMPs envolve a formação de poros da membrana. Por outro lado, estudos em células de mamíferos mostraram que os AMPs podem promover a morte celular por apoptose, causando danos as mitocôndrias, autofagia ou necrose (PAREDES-GAMERO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2022). Em organismos multicelulares e em todos os protozoários que abrigam mitocôndrias, as vias que levam à morte celular programada (PCD) estão localizadas nas mitocôndrias, no entanto observamos que *T. vaginalis* apresenta um tipo de morte celular diferente da clássica, pois trata-se de organismo amitocondriado (CHOSE *et al.*, 2003). Nesses organismos, a "maquinaria de morte celular mitocondrial" supostamente está ausente, e os mecanismos que levam à morte celular ainda precisam ser elucidados (MARIANTE *et al.*, 2006). Portanto para melhor compreender o mecanismo de morte do FB5 nos trofozoítos será realizada a microscopia eletrônica, que permite a visualização de pequenas modificações ultraestruturais que acompanham a morte celular, incluindo lacunas no plasma e/ou na membrana, inchaço dos hidrogenossomos e as primeiras fases de condensação da cromatina (GALLUZZI *et al.*, 2018)

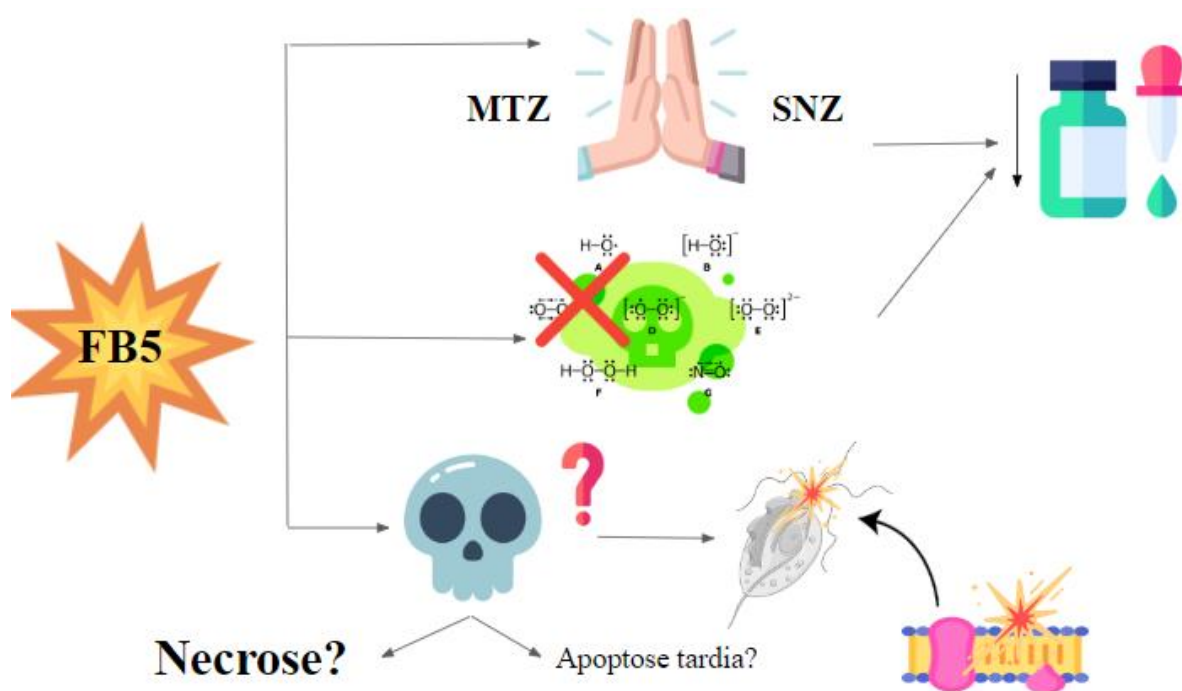


Figura 1. Esquema representativo dos resultados obtidos a partir do artigo de dados.

VII. Conclusões

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

1. Os peptídeos FB5, FB7 e FB8 apresentaram atividade frente a isolados de *T. vaginalis*;
2. Os peptídeos FB5, FB7 e FB8 inibiram o crescimento do parasito, a partir de 2 h quando testados na MIC;
3. Os peptídeos não apresentaram atividade hemolítica quando testados com eritrócitos humanos;
4. Os peptídeos apresentaram adequados índices de seletividade *in vitro*, com destaque ao FB5 que apresentou valores superiores a 10, caracterizando-o como promissor para seguir em testes *in vivo*;
5. Efeito sinérgico foi observado na associação de FB5 e MTZ e SNZ e o peptídeo não causou aumento das espécies reativas de oxigênio nos parasitos, indicando mecanismo de ação distinto ao dos fármacos usados no tratamento;
6. Características semelhantes ao processo de morte por apoptose tardia e necrose foram observadas nos trofozoítos após tratamento com FB5.

Considerando o potencial tricomonocida de peptídeos sintéticos demonstrado no presente estudo, sugerem-se as seguintes perspectivas:

a) Analisar a ultraestrutura de trofozoítos tratados com FB5 através de microscopia eletrônica de varredura e transmissão;

b) Determinar MIC e IC₅₀ do peptídeo FB5 para outros isolados clínicos frescos de *T. vaginalis*.

IX. Referências Bibliográficas

- Alderete JF, Provenzano D, Lehker MW. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microb Pathog.* 1995 Aug;19(2):93-103. doi: 10.1006/mpat.1995.0049. PMID: 8577239.
- Ambrozio CL, Nagel AS, Jeske S, Bragança GC, Borsuk S, Villela MM. *Trichomonas vaginalis* PREVALENCE AND RISK FACTORS FOR WOMEN IN SOUTHERN BRAZIL. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2016 Sep 22;58:61. doi: 10.1590/S1678-9946201658061. PMID: 27680166; PMCID: PMC5048632.
- Balkus JE, Richardson BA, Mochache V, Chohan V, Chan JD, Masese L, Shafi J, Marrazzo J, Farquhar C, McClelland RS. A prospective cohort study comparing the effect of single-dose 2 g metronidazole on *Trichomonas vaginalis* infection in HIV-seropositive versus HIV-seronegative women. *Sex Transm Dis.* 2013 Jun;40(6):499-505. doi: 10.1097/OLQ.0b013e31828f34. PMID: 23677023; PMCID: PMC3676301.
- Barr SC, Rose D, Jaynes JM. Activity of lytic peptides against intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes in vitro and parasitemias in mice. *J Parasitol.* 1995 Dec;81(6):974-8. PMID: 8544074.
- Beach DH, Holz GG Jr, Singh BN, Lindmark DG. Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol.* 1990 Jan 15;38(2):175-90. doi: 10.1016/0166-6851(90)90021-d. PMID: 2325705.
- Benchimol M. Trichomonads under Microscopy. *Microsc Microanal.* 2004 Oct;10(5):528-50. doi: 10.1017/S1431927604040905. PMID: 15525428.
- Bin Hafeez A, Jiang X, Bergen PJ, Zhu Y. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 28;22(21):11691. doi: 10.3390/ijms222111691. PMID: 34769122; PMCID: PMC8583803.
- Bradic M, Warring SD, Tooley GE, Scheid P, Secor WE, Land KM, Huang PJ, Chen TW, Lee CC, Tang P, Sullivan SA, Carlton JM. Genetic Indicators of Drug Resistance in the Highly Repetitive Genome of *Trichomonas vaginalis*. *Genome Biol Evol.* 2017 Jun 1;9(6):1658-1672. doi: 10.1093/gbe/evx110. PMID: 28633446; PMCID: PMC5522705.
- Brown DM, Upcroft JA, Dodd HN, Chen N, Upcroft P. Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem*

- Parasitol. 1999 Jan 25;98(2):203-14. doi: 10.1016/s0166-6851(98)00169-8. PMID: 10080389.
- de Brum Vieira P, Tasca T, Secor WE. Challenges and Persistent Questions in the Treatment of Trichomoniasis. *Curr Top Med Chem*. 2017;17(11):1249-1265. doi: 10.2174/1568026616666160930150429. PMID: 27697044; PMCID: PMC10169758.
- Boparai JK, Sharma PK. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein Pept Lett*. 2020;27(1):4-16. doi: 10.2174/0929866526666190822165812. PMID: 31438824; PMCID: PMC6978648.
- Casta e Silva Filho F, de Souza W, Lopes JD. Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Nov;85(21):8042-6. doi: 10.1073/pnas.85.21.8042. PMID: 2973059; PMCID: PMC282350.
- Chose O, Sarde CO, Gerbod D, Viscogliosi E, Roseto A. Programmed cell death in parasitic protozoans that lack mitochondria. *Trends Parasitol*. 2003 Dec;19(12):559-64. doi: 10.1016/j.pt.2003.09.016. PMID: 14642765.
- Conrad MD, Gorman AW, Schillinger JA, Fiori PL, Arroyo R, Malla N, Dubey ML, Gonzalez J, Blank S, Secor WE, Carlton JM. Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(3):e1573. doi: 10.1371/journal.pntd.0001573. Epub 2012 Mar 27. PMID: 22479659; PMCID: PMC3313929.
- Cosar C, Julou L. Activité de l'(hydroxy-2'éthyl)-1 méthyl-2 nitro-5 imidazole (8.823 R. P.) vis-à-vis des infections expérimentales à *Trichomonas vaginalis* [The activity of 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (R. P. 8823) against experimental *Trichomonas vaginalis* infections]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. 1959 Feb;96(2):238-41. French. PMID: 13627590.
- Cooper MA, Williams DH. Binding of glycopeptide antibiotics to a model of a vancomycin-resistant bacterium. *Chem Biol*. 1999 Dec;6(12):891-9. doi: 10.1016/s1074-5521(00)80008-3. PMID: 10631517.
- Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber GE. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Oct;17(4):783-93, table of contents.

doi: 10.1128/CMR.17.4.783-793.2004. PMID: 15489348; PMCID: PMC523556.

Daskalakis G, Psarris A, Koutras A, Fasoulakis Z, Prokopakis I, Varthaliti A, Karasmani C, Ntounis T, Domali E, Theodora M, Antsaklis P, Pappa KI, Papapanagiotou A. Maternal Infection and Preterm Birth: From Molecular Basis to Clinical Implications. *Children (Basel)*. 2023 May 22;10(5):907. doi: 10.3390/children10050907. PMID: 37238455; PMCID: PMC10217143.

Dathe M, Schümann M, Wieprecht T, Winkler A, Beyermann M, Krause E, Matsuzaki K, Murase O, Bienert M. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry*. 1996 Sep 24;35(38):12612-22. doi: 10.1021/bi960835f. PMID: 8823199.

Demes P, Gombosová A, Valent M, Jánoska A, Fabusová H, Petrenko M. Differential susceptibility of fresh *Trichomonas vaginalis* isolates to complement in menstrual blood and cervical mucus. *Genitourin Med*. 1988 Jun;64(3):176-9. doi: 10.1136/sti.64.3.176. PMID: 3261708; PMCID: PMC1194195.

Deo S, Turton KL, Kainth T, Kumar A, Wieden HJ. Strategies for improving antimicrobial peptide production. *Biotechnol Adv*. 2022 Oct;59:107968. doi: 10.1016/j.biotechadv.2022.107968. Epub 2022 Apr 28. PMID: 35489657.

Dubos RJ. STUDIES ON A BACTERICIDAL AGENT EXTRACTED FROM A SOIL BACILLUS : I. PREPARATION OF THE AGENT. ITS ACTIVITY *IN VITRO*. *J Exp Med*. 1939 Jun 30;70(1):1-10. doi: 10.1084/jem.70.1.1. PMID: 19870884; PMCID: PMC2133784.

Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue PJ, Upcroft JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res*. 2003 Aug;13(4):239-49. doi: 10.1038/sj.cr.7290169. PMID: 12974614.

Ellis JE, Cole D, Lloyd D. Influence of oxygen on the fermentative metabolism of metronidazole-sensitive and resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*. 1992 Nov;56(1):79-88. doi: 10.1016/0166-6851(92)90156-e. PMID: 1475004.

- Ellis JE, Yarlett N, Cole D, Humphreys MJ, Lloyd D. Antioxidant defences in the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*: comparison of metronidazole-resistant and sensitive strains. *Microbiology (Reading)*. 1994 Sep;140 (Pt 9):2489-94. doi: 10.1099/13500872-140-9-2489. PMID: 7952198.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337. PMID: 17562483; PMCID: PMC2117903.
- Fichorova R, Fraga J, Rappelli P, Fiori PL. *Trichomonas vaginalis* infection in symbiosis with *Trichomonasvirus* and *Mycoplasma*. *Res Microbiol*. 2017 Nov-Dec;168(9-10):882-891. doi: 10.1016/j.resmic.2017.03.005. Epub 2017 Mar 31. PMID: 28366838; PMCID: PMC8130574.
- Fichorova RN. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *J Reprod Immunol*. 2009 Dec;83(1-2):185-9. doi: 10.1016/j.jri.2009.08.007. Epub 2009 Oct 21. PMID: 19850356; PMCID: PMC2788009.
- Fieck A, Hurwitz I, Kang AS, Durvasula R. *Trypanosoma cruzi*: synergistic cytotoxicity of multiple amphipathic anti-microbial peptides to *T. cruzi* and potential bacterial hosts. *Exp Parasitol*. 2010 Aug;125(4):342-7. doi: 10.1016/j.exppara.2010.02.016. Epub 2010 Mar 3. PMID: 20206169; PMCID: PMC2875304.
- Figuroa-Angulo EE, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, Calla-Choque JS, Cárdenas-Guerra RE, Ortega-López J, Quintas-Granados LI, Alvarez-Sánchez ME, Arroyo R. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect*. 2012 Dec;14(15):1411-27. doi: 10.1016/j.micinf.2012.09.004. Epub 2012 Sep 25. PMID: 23022315.
- Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Castedo M, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, De Laurenzi V, De Maria R, Deshmukh M, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Golstein P, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnóczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Jäättelä M, Kepp O, Kimchi A, Klionsky DJ, Knight RA, Kornbluth S,

Kumar S, Levine B, Lipton SA, Lugli E, Madeo F, Malorni W, Marine JC, Martin SJ, Medema JP, Mehlen P, Melino G, Moll UM, Morselli E, Nagata S, Nicholson DW, Nicotera P, Nuñez G, Oren M, Penninger J, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Scorrano L, Simon HU, Steller H, Tschopp J, Tsujimoto Y, Vandenabeele P, Vitale I, Vousden KH, Youle RJ, Yuan J, Zhivotovsky B, Kroemer G. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* 2009 Aug;16(8):1093-107. doi: 10.1038/cdd.2009.44. Epub 2009 Apr 17. PMID: 19373242; PMCID: PMC2757140.

Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, Candi E, Carmona-Gutierrez D, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Conrad M, Cubillos-Ruiz JR, Czabotar PE, D'Angiolella V, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, DeBerardinis RJ, Deshmukh M, Di Daniele N, Di Virgilio F, Dixit VM, Dixon SJ, Duckett CS, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Elrod JW, Fimia GM, Fulda S, García-Sáez AJ, Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jäättelä M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O, Kimchi A, Kitsis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, López-Otín C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkenstein JD, Moll UM, Muñoz-Pinedo C, Nagata S, Nuñez G, Oberst A, Oren M, Overholtzer M, Pagano M, Panaretakis T, Pasparakis M, Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JHM, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rehm M, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Ryan

- KM, Sayan E, Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell BR, Strasser A, Szabadkai G, Tait SWG, Tang D, Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden MG, Villunger A, Virgin HW, Vousden KH, Vucic D, Wagner EF, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Zitvogel L, Melino G, Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018 Mar;25(3):486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4. Epub 2018 Jan 23. PMID: 29362479; PMCID: PMC5864239.
- Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Curr Opin Immunol.* 1994 Aug;6(4):584-9. doi: 10.1016/0952-7915(94)90145-7. PMID: 7946046.
- Giordani RB, Junior CO, de Andrade JP, Bastida J, Zuanazzi JA, Tasca T, de Almeida MV. Lycorine derivatives against *Trichomonas vaginalis*. *Chem Biol Drug Des.* 2012 Jul;80(1):129-33. doi: 10.1111/j.1747-0285.2012.01333.x. Epub 2012 Apr 30. PMID: 22260620.
- Graves KJ, Novak J, Secor WE, Kissinger PJ, Schwebke JR, Muzny CA. A systematic review of the literature on mechanisms of 5-nitroimidazole resistance in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology.* 2020 Nov;147(13):1383-1391. doi: 10.1017/S0031182020001237. Epub 2020 Jul 30. PMID: 32729451; PMCID: PMC7677174.
- Grogl M, Hickman M, Ellis W, Hudson T, Lazo JS, Sharlow ER, Johnson J, Berman J, Sciotti RJ. Drug discovery algorithm for cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Feb;88(2):216-21. doi: 10.4269/ajtmh.11-0812. PMID: 23390221; PMCID: PMC3583307.
- Gumbo FZ, Duri K, Kandawasvika GQ, Kurewa NE, Mapingure MP, Munjoma MW, Rusakaniko S, Chirenje MZ, Stray-Pedersen B. Risk factors of HIV vertical transmission in a cohort of women under a PMTCT program at three peri-urban clinics in a resource-poor setting. *J Perinatol.* 2010 Nov;30(11):717-23. doi: 10.1038/jp.2010.31. Epub 2010 Mar 25. PMID: 20336078; PMCID: PMC2994594.
- Hancock RE, Nijnik A, Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Mar 16;10(4):243-54. doi: 10.1038/nrmicro2745. PMID: 22421877.

- Harp DF, Chowdhury I. Trichomoniasis: evaluation to execution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011 Jul;157(1):3-9. doi: 10.1016/j.ejogrb.2011.02.024. Epub 2011 Mar 25. PMID: 21440359; PMCID: PMC4888369.
- Hernandez-Flores JL, Rodriguez MC, Gastelum Arellanez A, Alvarez-Morales A, Avila EE. Effect of recombinant prophenin 2 on the integrity and viability of *Trichomonas vaginalis*. *Biomed Res Int.* 2015;2015:430436. doi: 10.1155/2015/430436. Epub 2015 Mar 1. PMID: 25815316; PMCID: PMC4359812.
- Hollmann A, Martinez M, Maturana P, Semorile LC, Maffia PC. Antimicrobial Peptides: Interaction With Model and Biological Membranes and Synergism With Chemical Antibiotics. *Front Chem.* 2018 Jun 5;6:204. doi: 10.3389/fchem.2018.00204. PMID: 29922648; PMCID: PMC5996110.
- 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 PJ. Single-Dose Compared With Multidose Metronidazole for the Treatment of Trichomoniasis in Women: A Meta-Analysis. *Sex Transm Dis.* 2017 Jan;44(1):29-34. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000537. PMID: 27898571; PMCID: PMC5145758.
- Hübner DPG, de Brum Vieira P, Frasson AP, Menezes CB, Senger FR, Santos da Silva GN, Baggio Gnoatto SC, Tasca T. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of betulinic acid derivatives. *Biomed Pharmacother.* 2016 Dec;84:476-484. doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.064. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27685791.
- Infante VV, Miranda-Olvera AD, De Leon-Rodriguez LM, Anaya-Velazquez F, Rodriguez MC, Avila EE. Effect of the antimicrobial peptide tritrpticin on the in vitro viability and growth of *Trichomonas vaginalis*. *Curr Microbiol.* 2011 Jan;62(1):301-6. doi: 10.1007/s00284-010-9709-z. Epub 2010 Jul 17. PMID: 20640424.
- Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol.* 2005 Mar;52(3 Pt 1):381-90; quiz 391-2. doi: 10.1016/j.jaad.2004.08.026. PMID: 15761415.

- Kang HK, Kim C, Seo CH, Park Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *J Microbiol.* 2017 Jan;55(1):1-12. doi: 10.1007/s12275-017-6452-1. Epub 2016 Dec 30. PMID: 28035594.
- Kissinger P. Epidemiology and treatment of trichomoniasis. *Curr Infect Dis Rep.* 2015 Jun;17(6):484. doi: 10.1007/s11908-015-0484-7. PMID: 25925796; PMCID: PMC5030197.
- Kissinger P, Mena L, Levison J, Clark RA, Gatski M, Henderson H, Schmidt N, Rosenthal SL, Myers L, Martin DH. A randomized treatment trial: single versus 7-day dose of metronidazole for the treatment of *Trichomonas vaginalis* among HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010 Dec 15;55(5):565-71. doi: 10.1097/QAI.0b013e3181eda955. PMID: 21423852; PMCID: PMC3058179.
- Kusdian G, Gould SB. The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. *Mol Biochem Parasitol.* 2014 Dec;198(2):92-9. doi: 10.1016/j.molbiopara.2015.01.004. Epub 2015 Feb 9. PMID: 25677793.
- Lamp KC, Freeman CD, Klutman NE, Lacy MK. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. *Clin Pharmacokinet.* 1999 May;36(5):353-73. doi: 10.2165/00003088-199936050-00004. PMID: 10384859.
- Land KM, Clemens DL, Johnson PJ. Loss of multiple hydrogenosomal proteins associated with organelle metabolism and high-level drug resistance in trichomonads. *Exp Parasitol.* 2001 Feb;97(2):102-10. doi: 10.1006/expr.2001.4587. PMID: 11281707.
- Le CF, Fang CM, Sekaran SD. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Mar 24;61(4):e02340-16. doi: 10.1128/AAC.02340-16. PMID: 28167546; PMCID: PMC5365711.
- Lehker MW, Alderete JF. Biology of trichomonosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2000 Feb;13(1):37-45. doi: 10.1097/00001432-200002000-00007. PMID: 11964771.
- Leitsch D. Recent advances in the molecular biology of the protist parasite *Trichomonas vaginalis*. *Fac Rev.* 2021 Mar 4;10:26. doi: 10.12703/r/10-26. PMID: 33718943; PMCID: PMC7946386.

- Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ. Antimicrobial peptides in action. *J Am Chem Soc.* 2006 Sep 20;128(37):12156-61. doi: 10.1021/ja062927q. PMID: 16967965.
- Lindmark DG, Eckenrode BL, Halberg LA, Dinbergs ID. Carbohydrate, energy and hydrogenosomal metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *J Protozool.* 1989 Mar-Apr;36(2):214-6. doi: 10.1111/j.1550-7408.1989.tb01076.x. PMID: 2657037.
- da Luz Becker D, dos Santos O, Frasson AP, de Vargas Rigo G, Macedo AJ, Tasca T. High rates of double-stranded RNA viruses and *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* clinical isolates in South Brazil. *Infect Genet Evol.* 2015 Aug;34:181-7. doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.005. Epub 2015 Jul 6. PMID: 26160539.
- Mariante RM, Vancini RG, Benchimol M. Cell death in trichomonads: new insights. *Histochem Cell Biol.* 2006 May;125(5):545-56. doi: 10.1007/s00418-005-0098-5. Epub 2005 Nov 5. PMID: 16273383.
- Marques-Silva M, Lisboa C, Gomes N, Rodrigues AG. *Trichomonas vaginalis* and growing concern over drug resistance: a systematic review. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2021 Oct;35(10):2007-2021. doi: 10.1111/jdv.17461. Epub 2021 Jul 26. PMID: 34146427.
- Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Aug;8(8):603-12. doi: 10.1038/nrm2216. PMID: 17609668.
- 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.* 2016 Jun 27;3(9):404-419. doi: 10.15698/mic2016.09.526. PMID: 28357378; PMCID: PMC5354568.
- Mohammadi-Berenjestanaki H, Khori V, Shirzad-Aski H, Ghaemi EA. *In Vitro* Synergistic Effect of Vancomycin and Some Antibacterial Agents Against Clinical Methicillin-Resistant and Sensitive *Staphylococcus aureus* Isolates. *Microb Drug Resist.* 2020 Mar;26(3):218-226. doi: 10.1089/mdr.2019.0003. Epub 2019 Aug 19. PMID: 31424323.
- Müller M, Gorrell TE. Metabolism and metronidazole uptake in *Trichomonas vaginalis* isolates with different metronidazole susceptibilities. *Antimicrob*

- Agents Chemother. 1983 Nov;24(5):667-73. doi: 10.1128/AAC.24.5.667. PMID: 6607028; PMCID: PMC185921.
- Muzny CA, Schwebke JR, Nyirjesy P, Kaufman G, Mena LA, Lazenby GB, Van Gerwen OT, Graves KJ, Arbuckle J, Carter BA, McMahon CP, Eder S, Shaw J, Pandey B, Chavoustie SE (2021) Efficacy and Safety of Single Oral Dosing of Secnidazole for Trichomoniasis in Women: Results of a Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Delayed-Treatment Study. Clin Infect Dis 73:e1282–e1289. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab242>
- Muzny CA, Van Gerwen OT. Secnidazole for Trichomoniasis in Women and Men. Sex Med Rev. 2022 Apr;10(2):255-262. doi: 10.1016/j.sxmr.2021.12.004. Epub 2022 Feb 10. PMID: 35153156.
- Mtshali A, Ngcapu S, Govender K, Sturm AW, Moodley P, Joubert BC. In Vitro Effect of 5-Nitroimidazole Drugs against *Trichomonas vaginalis* Clinical Isolates. Microbiol Spectr. 2022 Aug 31;10(4):e0091222. doi: 10.1128/spectrum.00912-22. Epub 2022 Jul 13. PMID: 35863010; PMCID: PMC9430554.
- Nava-Zuazo C, Estrada-Soto S, Guerrero-Alvarez J, León-Rivera I, Molina-Salinas GM, Said-Fernández S, Chan-Bacab MJ, Cedillo-Rivera R, Moo-Puc R, Mirón-López G, Navarrete-Vazquez G. Design, synthesis, and in vitro antiprotozoal, antimycobacterial activities of N-{2-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]ethyl}ureas. Bioorg Med Chem. 2010 Sep 1;18(17):6398-403. doi: 10.1016/j.bmc.2010.07.008. Epub 2010 Jul 30. PMID: 20674375.
- Nicolas P. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. FEBS J. 2009 Nov;276(22):6483-96. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07359.x. Epub 2009 Oct 9. PMID: 19817856.
- Nogradio K, Adisakwattana P, Reamtong O. Antimicrobial peptides: On future antiprotozoal and anthelmintic applications. Acta Trop. 2022 Nov;235:106665. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106665. Epub 2022 Aug 24. PMID: 36030045.
- Paredes-Gamero EJ, Martins MN, Cappabianco FA, Ide JS, Miranda A. Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption. Biochim Biophys Acta. 2012

- Jul;1820(7):1062-72. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.02.015. Epub 2012 Mar 7. PMID: 22425533.
- Park CB, Kim HS, Kim SC. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Mar 6;244(1):253-7. doi: 10.1006/bbrc.1998.8159. PMID: 9514864.
- Paulish-Miller TE, Augustini P, Schuyler JA, Smith WL, Mordechai E, Adelson ME, Gyax SE, Secor WE, Hilbert DW. *Trichomonas vaginalis* metronidazole resistance is associated with single nucleotide polymorphisms in the nitroreductase genes ntr4Tv and ntr6Tv. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 May;58(5):2938-43. doi: 10.1128/AAC.02370-13. Epub 2014 Feb 18. PMID: 24550324; PMCID: PMC3993245.
- Pereira-Neves A, Benchimol M. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol Cell*. 2007 Feb;99(2):87-101. doi: 10.1042/BC20060084. PMID: 17029588.
- Pereira-Neves A, Ribeiro KC, Benchimol M. Pseudocysts in trichomonads--new insights. *Protist*. 2003 Oct;154(3-4):313-29. doi: 10.1078/143446103322454095. PMID: 14658492.
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Apr;11(2):300-17. doi: 10.1128/CMR.11.2.300. PMID: 9564565; PMCID: PMC106834.
- Price CM, Peters RPH, Steyn J, Mudau M, Olivier D, De Vos L, Morikawa E, Kock MM, Medina-Marino A, Klausner JD. Prevalence and Detection of *Trichomonas vaginalis* in HIV-Infected Pregnant Women. *Sex Transm Dis*. 2018 May;45(5):332-336. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000756. PMID: 29465686; PMCID: PMC5897177.
- Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*. 1992 Dec 15;31(49):12416-23. doi: 10.1021/bi00164a017. PMID: 1463728.
- Rasoloson D, Tomková E, Cammack R, Kulda J, Tachezy J. Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility

- to oxygen. *Parasitology*. 2001 Jul;123(Pt 1):45-56. doi: 10.1017/s0031182001008022. PMID: 11467782.
- Rapaport D, Shai Y. Interaction of fluorescently labeled pardaxin and its analogues with lipid bilayers. *J Biol Chem*. 1991 Dec 15;266(35):23769-75. PMID: 1748653.
- Rigo GV, Frank LA, Galego GB, Santos ALSd, 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>
- Rigo GV, Petro-Silveira B, Devereux M, McCann M, Souza Dos Santos AL, Tasca T. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based metallodrugs and synergistic effect with metronidazole. *Parasitology*. 2019 Aug;146(9):1179-1183. doi: 10.1017/S003118201800152X. Epub 2018 Sep 12. PMID: 30207253.
- Rigo GV, Willig JB, Devereux M, McCann M, Souza Dos Santos AL, Tasca T. Oxidative damage by 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its silver and copper complexes lead to apoptotic-like death in *Trichomonas vaginalis*. *Res Microbiol*. 2023 May;174(4):104015. doi: 10.1016/j.resmic.2022.104015. Epub 2022 Dec 22. PMID: 36566772.
- Robinson, S. C. (1962). Trichomonal vaginitis resistant to metronidazole. *Canadian Medical Association Journal*, 86, 665.
- Schwebke JR, Burgess D. Trichomoniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Oct;17(4):794-803, table of contents. doi: 10.1128/CMR.17.4.794-803.2004. PMID: 15489349; PMCID: PMC523559.
- Secor WE, Meites E, Starr MC, Workowski KA. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 May;90(5):800-804. doi: 10.4269/ajtmh.13-0723. PMID: 24808247; PMCID: PMC4015567.
- Sengupta D, Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Oct;1778(10):2308-17. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.06.007. Epub 2008 Jun 18. PMID: 18602889.

- Sheehy O, Santos F, Ferreira E, Berard A. The use of metronidazole during pregnancy: a review of evidence. *Curr Drug Saf.* 2015;10(2):170-9. doi: 10.2174/157488631002150515124548. PMID: 25986038.
- Silver BJ, Guy RJ, Kaldor JM, Jamil MS, Rumbold AR. *Trichomonas vaginalis* as a cause of perinatal morbidity: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Dis.* 2014 Jun;41(6):369-76. doi: 10.1097/OLQ.000000000000134. PMID: 24825333.
- Singh BN, Hayes GR, Lucas JJ, Sommer U, Viseux N, Mirgorodskaya E, Trifonova RT, Sassi RR, Costello CE, Fichorova RN. Structural details and composition of *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan in relevance to the epithelial immune function. *Glycoconj J.* 2009 Jan;26(1):3-17. doi: 10.1007/s10719-008-9157-1. Epub 2008 Jul 6. PMID: 18604640; PMCID: PMC2637367.
- Song HO, Shin MH, Ahn MH, Min DY, Kim YS, Ryu JS. *Trichomonas vaginalis*: reactive oxygen species mediates caspase-3 dependent apoptosis of human neutrophils. *Exp Parasitol.* 2008 Jan;118(1):59-65. doi: 10.1016/j.exppara.2007.06.010. Epub 2007 Jul 13. PMID: 17709105.
- Steckbeck JD, Deslouches B, Montelaro RC. Antimicrobial peptides: new drugs for bad bugs? *Expert Opin Biol Ther.* 2014 Jan;14(1):11-4. doi: 10.1517/14712598.2013.844227. Epub 2013 Nov 11. PMID: 24206062; PMCID: PMC4109705.
- Thorburn AL. Alfred François Donné, 1801-1878, discoverer of *Trichomonas vaginalis* and of leukaemia. *Br J Vener Dis.* 1974 Oct;50(5):377-80. doi: 10.1136/sti.50.5.377. PMID: 4138951; PMCID: PMC1045069.
- Torres-Romero JC, Arroyo R. Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infect Genet Evol.* 2009 Dec;9(6):1065-74. doi: 10.1016/j.meegid.2009.06.003. Epub 2009 Jun 16. PMID: 19539055.
- Tripathi AK, Vishwanatha JK. Role of Anti-Cancer Peptides as Immunomodulatory Agents: Potential and Design Strategy. *Pharmaceutics.* 2022 Dec 1;14(12):2686. doi: 10.3390/pharmaceutics14122686. PMID: 36559179; PMCID: PMC9781574.

- Tulchinsky TH, Varavikova EA. Communicable Diseases. The New Public Health. 2014:149–236. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415766-8.00004-5>.
- Van Gerwen OT and Muzny CA. Recent advances in the epidemiology, diagnosis, and management of *Trichomonas vaginalis* infection [version 1; peer review: 2 Approved] F1000Research 2019, 8(F1000 Faculty Rev):1666 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.19972.1>)
- Van Gerwen OT, Camino AF, Sharma J, Kissinger PJ, Muzny CA. Epidemiology, Natural History, Diagnosis, and Treatment of *Trichomonas vaginalis* in Men. Clin Infect Dis. 2021 Sep 15;73(6):1119-1124. doi: 10.1093/cid/ciab514. PMID: 34079999; PMCID: PMC8522801. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol Rev. 2003 Mar;55(1):27-55. doi: 10.1124/pr.55.1.2. PMID: 12615953.
- Wang H, Zhang C, Li M, Liu C, Wang J, Ou X, Han Y. Antimicrobial Peptides Mediate Apoptosis by Changing Mitochondrial Membrane Permeability. Int J Mol Sci. 2022 Oct 22;23(21):12732. doi: 10.3390/ijms232112732. PMID: 36361521; PMCID: PMC9653759.
- Weber JI, Rigo GV, Rocha DA, Fortes IS, Seixas A, de Andrade SF, Tasca T. Modulation of peptidases by 2,4-diamine-quinazoline derivative induces cell death in the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. Biomed Pharmacother. 2021 Jul;139:111611. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111611. Epub 2021 May 28. PMID: 34243597.
- Workowski KA, Bachmann LH, Chan PA, Johnston CM, Muzny CA, Park I, Reno H, Zenilman JM, Bolan GA. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. MMWR Recomm Rep. 2021 Jul 23;70(4):1-187. doi: 10.15585/mmwr.rr7004a1. PMID: 34292926; PMCID: PMC8344968.
- Workowski KA, Bolan GA; Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep. 2015 Jun 5;64(RR-03):1-137. Erratum in: MMWR Recomm Rep. 2015 Aug 28;64(33):924. PMID: 26042815; PMCID: PMC5885289.

- Zaiou M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med (Berl)*. 2007 Apr;85(4):317-29. doi: 10.1007/s00109-006-0143-4. Epub 2007 Jan 10. PMID: 17216206.
- Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002 Jan 24;415(6870):389-95. doi: 10.1038/415389a. PMID: 11807545.
- Zhang Z, Li D, Li Y, Zhang R, Xie X, Yao Y, Zhao L, Tian X, Yang Z, Wang S, Yue X, Mei X. The correlation between *Trichomonas vaginalis* infection and reproductive system cancer: a systematic review and meta-analysis. *Infect Agent Cancer*. 2023 Mar 2;18(1):15. doi: 10.1186/s13027-023-00490-2. PMID: 36864428; PMCID: PMC9979407.