

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**HIDRÓLISE EXTRACELULAR DE NUCLEOTÍDEOS EM
Trichomonas vaginalis: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA
E LOCALIZAÇÃO ENZIMÁTICA**

TIANA TASCA

Orientador:

PROF. DR. JOÃO JOSÉ FREITAS SARKIS

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como
requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.**

Porto Alegre

2005

**UFRGS
Inst. de Ciências Básicas da Saúde
Biblioteca**

**Ao meu pai, Nicolau,
meu exemplo de vida.**

**Ao Luís,
à minha mãe, Terezinha e
à Lucia,
pela incondicional presença.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João José Freitas Sarkis, pela orientação, pelo ensinamento, pelo apoio e incentivo fundamentais em todos os momentos do desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Geraldo Attilio De Carli, pelo incentivo e apoio constantes, pela amizade e confiança em mim depositada. Pela oportunidade concedida de poder realizar este estudo em colaboração com o Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia, PUCRS e pelo apoio fundamental para realizar o Doutorado-Sanduíche.

À Profa. Dra. Carla Denise Bonan pela grande amizade que construímos durante este período, pelo apoio e incentivo sempre constantes e pelo muito que aprendi ao seu lado.

Ao Prof. Dr. Sérgio De Meda Lamb, por permitir que o trabalho fosse desenvolvido no Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia, PUCRS.

Aos bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia, PUCRS, Iveli, Paola, Rafael, Renata e à mestranda Fernanda pela ajuda, amizade, companheirismo e momentos de descontração e alegria vividos no nosso dia-a-dia.

A todos os colegas do grupo de pesquisa dos Laboratórios 22 e 24, pela ajuda e amizade, em especial à Profa. Dra. Ana Maria O. Battastini, pelo apoio e incentivo e à Profa. Dra. Márcia Wink pela ajuda e apoio durante o Doutorado-Sanduíche.

Aos bolsistas Fernanda, Giana, Eduardo, Mário e Elisa, e a todos os professores do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica da Faculdade de Biociências, PUCRS, pela amizade e apoio constantes, em especial ao Prof. Dr. Renato Dutra Dias, pelo incentivo constante desde o início deste estudo.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME), UFRGS, em especial à Christiane pela amizade e ajuda no estudo da citotóxica enzimática.

A todos os colegas do laboratório coordenado pelo Prof. Dr. John F. Alderete, Department of Microbiology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, em especial à Ashwini, pela valiosa ajuda e por todo o ensinamento. Ao Prof. Alderete, pelo incentivo constante e exemplo de dedicação à ciência e luta pela educação de qualidade. À Anna Uriegas, pela acolhida em San Antonio e pelo companheirismo.

A todos os funcionários e professores da Faculdade de Farmácia da PUCRS, em especial à Fabiana, à Vanessa e ao Ícaro, pela amizade e apoio.

Ao Departamento de Bioquímica, em especial à Cléia, por toda a ajuda.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e à FAPERGS, CNPq, PRONEX e TWA pelo auxílio à pesquisa.

À minha família e aos amigos, em especial à Cássia e à Silvana, pelo apoio e incentivo principalmente nas horas difíceis.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABELAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
I. INTRODUÇÃO	01
I.1. <i>Trichomonas vaginalis</i>	02
I.1.1. Aspectos morfológicos de <i>T. vaginalis</i>	02
I.1.2. Aspectos bioquímicos de <i>T. vaginalis</i>	03
I.1.3. Tricomonose	06
I.2. Efeitos dos nucleotídeos extracelulares.....	14
I.3. Ectonucleotidasas.....	16
I.3.1. Nucleosídeo trifosfato difosfoidrolases	17
I.3.2. Ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5).....	24
I.3.3. Localização citoquímica das ectonucleotidasas	25
I.4. OBJETIVOS	26
II. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	29
II.1. CAPÍTULO 1 - <u>Tasca, T.</u>, Bonan, C.D., De Carli, G.A., Battastini, A.M., Sarkis, J.J. (2003). Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity from intact cells of <i>Trichomonas vaginalis</i>. Experimental Parasitology 105: 167-173.....	29

II.2. CAPÍTULO 2 - <u>Tasca, T.</u>, Borges, F.P, Bonan, C.D., De Carli, G.A., Battastini, A.M., Sarkis, J.J. (2003). Effects of metronidazole and tinidazole on NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase from intact cells of <i>Trichomonas vaginalis</i>. FEMS Microbiology Letters 226: 379-384.....	37
II.3. CAPÍTULO 3 - <u>Tasca, T.</u>, Bonan, C.D., De Carli, G.A., Sarkis, J.J. (2004). <i>Trichomonas vaginalis</i>: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability. Parasitology Research 93: 300-303.....	44
II.4. CAPÍTULO 4 - <u>Tasca, T.</u>, Bonan, C.D., De Carli, G.A., Sarkis, J.J., Alderete, J.F. Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of <i>Trichomonas vaginalis</i>. Parasitology (no prelo).....	49
II.5. CAPÍTULO 5 – A) Análise molecular da nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase – NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase de <i>Trichomonas vaginalis</i> e B) Purificação da NTPDase de <i>Trichomonas vaginalis</i> – Dados preliminares	58
III. DISCUSSÃO	84
IV. CONCLUSÕES GERAIS	97
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
VI. ANEXOS	116

RESUMO

Trichomonas vaginalis é o protozoário flagelado causador da tricomonose, a doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum no mundo. O *T. vaginalis* tem se destacado como um importante patógeno e está associado a graves complicações de saúde. Considerando o sério impacto da tricomonose na saúde pública, é importante estudar os aspectos bioquímicos do *T. vaginalis* que contribuem para infecção do hospedeiro e patogênese. Nucleotídeos extracelulares estão envolvidos em uma variedade de funções fisiológicas e patológicas, além de apresentarem propriedades citotóxicas. Os nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados via ectonucleotidases, incluindo a família E-NTPDase (ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase) e a ecto-5'-nucleotidase. Uma atividade de NTPDase1 foi previamente caracterizada em *T. vaginalis*. Nossos resultados mostraram a caracterização de uma ecto-5'-nucleotidase dependente de magnésio e cálcio e com atividade máxima em pH alcalino. Os valores de K_m (Constante de Michaelis) situaram-se na faixa micromolar, com ampla especificidade a nucleosídeos monofosfatados. A atividade de ecto-5'-nucleotidase em *T. vaginalis* foi inibida pelo 5'-[α,β -metileno]difosfato (AMPCP), inibidor específico da enzima em vertebrados. O metronidazol e o tinidazol apresentaram efeitos diversos na atividade da NTPDase1 e da ecto-5'-nucleotidase de um isolado de *T. vaginalis* proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC) cultivado por longo período no laboratório e de um isolado clínico fresco. A hidrólise de ATP foi aumentada na presença de metronidazol no isolado ATCC. Por outro lado, ela foi inibida pelo tinidazol no isolado clínico fresco. O tratamento dos parasitos na presença de metronidazol por 2h inibiu a hidrólise de ATP e ADP, enquanto o tratamento com tinidazol inibiu as atividades ATPásica e ADPásica somente no isolado clínico fresco. Os fármacos não produziram efeitos significativos na atividade da ecto-5'-nucleotidase de ambos os isolados de *T. vaginalis* testados. Os dados sugerem a função da NTPDase1 como moduladora da concentração de nucleotídeos extracelulares na presença de metronidazol e tinidazol, uma condição adversa para o parasito. Através de citoquímica enzimática, ambas as enzimas demonstraram ecto-localização, confirmando os mecanismos presentes no parasito capazes de realizar hidrólise extracelular de nucleotídeos. Diferentes concentrações de nucleotídeos da adenina e de adenosina não exerceram efeitos citolíticos nos trofozoítos. As atividades ATPásica e ADPásica apresentam-se mais elevadas em isolados clínicos frescos em comparação a isolados cultivados por longos períodos. A heterogeneidade foi demonstrada entre os diferentes isolados de *T. vaginalis* com relação à razão de hidrólise ATP:ADP. Alguns isolados apresentaram razão de hidrólise ATP:ADP igual a 1:0,8, característica de NTPDase1, enquanto outros apresentaram uma razão de hidrólise ATP:ADP de aproximadamente 2:1. Os isolados de *T. vaginalis* apresentaram diferenças dramáticas nos níveis de atividade da ecto-5'-nucleotidase e, surpreendentemente, alguns isolados apresentaram muito baixa ou nenhuma atividade. Diferentes condições de cultivo foram testadas e não apresentaram efeitos na elevação dos níveis da atividade enzimática. A ausência de atividade de hidrólise de AMP pelo *T. vaginalis* pode acarretar importantes conseqüências para ambos hospedeiro e parasito durante a infecção. O cultivo dos parasitos em meio de cultura com e sem a adição de ferro não apresentou efeitos dramáticos na atividade da NTPDase dos diferentes isolados. Ao contrário, concentrações baixas e elevadas de ferro apresentaram decréscimo e aumento, respectivamente, na atividade da ecto-5'-nucleotidase daqueles isolados que apresentaram atividade sob condições normais de cultivo. Considerando os altos níveis de nucleotídeos púricos no sítio do *T. vaginalis*, a ausência de efeitos citolíticos nos parasitos e a ecto-localização das enzimas envolvidas na hidrólise de nucleotídeos, sugere-se que a NTPDase1 e a ecto-5'-nucleotidase modulam as concentrações extracelulares de ATP, ADP e AMP. O produto final dessas reações, o nucleosídeo adenosina, é recaptado pelas vias de salvação.

ABSTRACT

The flagellated protozoan, *Trichomonas vaginalis*, causes trichomonosis, the most prevalent non-viral sexually transmitted disease (STD) worldwide. Infection with *T. vaginalis* has major health consequences for women. Taking in account the serious impact caused by trichomonosis on public health, it is important to study the biochemical aspects of *T. vaginalis* that contribute with host infection and pathogenesis. Extracellular nucleotides are involved in several physiologic and pathologic functions, including cytotoxic properties. Nucleotides are hydrolyzed by ectonucleotidases, including E-NTPDase (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase) family and ecto-5'-nucleotidase. A NTPDase1 activity was previously characterized in *T. vaginalis*. Our results show the characterization of an ecto-5'-nucleotidase activity, magnesium- and calcium-dependent and with maximum activity in alkaline pH. K_m (Michaelis Constant) values are in the micromolar range, with broad monophosphate nucleosides specificity. The ecto-5'-nucleotidase activity from *T. vaginalis* was inhibited by 5'-[α,β -methylene]diphosphate (AMPCP), the specific inhibitor of this enzyme in vertebrates. Metronidazole and tinidazole presented different effects on NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase activities from *T. vaginalis* long-term-grown isolate from *American Type Culture Collection* (ATCC) and from a fresh clinical isolate. ATP hydrolysis was activated in presence of metronidazole in the ATCC strain, whilst it was inhibited by tinidazole in a fresh clinical isolate. The treatment of cells in presence of metronidazole for two hours inhibited ATP and ADP hydrolysis, whilst treatment with tinidazole inhibited ATP and ADP hydrolysis only in the fresh clinical isolate. The drugs did not change the ecto-5'-nucleotidase activity for both strains. Our results suggest that the modulation of extracellular ATP and ADP levels during treatment with these drugs could be a parasitic defence strategy as a survival mechanism in an adverse environment. Cytochemical localization showed that both NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase presented ecto-localization, reinforcing the mechanisms present in *T. vaginalis* capable to hydrolyze extracellular nucleotides. Different adenine nucleotides and adenosine concentrations did not produce any cytolytic effects on trophozoites. ATPase and ADPase activities were higher in fresh clinical isolates when compared to long-term-grown isolates. Heterogeneity on ATP:ADP hydrolysis ratio was shown among different *T. vaginalis* isolates. Some isolates had ATP:ADP hydrolysis ratio of 1:0.8, characteristic of NTPDase1, whilst other isolates presented ATP:ADP hydrolysis ratio of approximately 2:1. *T. vaginalis* isolates had dramatic differences in levels of ecto-5'-nucleotidase activity, and surprisingly, some isolates had little or no enzymatic activity. Different growth conditions were without effect in elevating levels of ecto-5'-nucleotidase activity. This lack of ecto-5'-nucleotidase activity by *T. vaginalis* may have important consequences for both host and parasite during infection. Growth of trichomonads in iron-replete and iron-depleted medium had overall little dramatic effect in distinct patterns in NTPDase activity among fresh isolates. In contrast, high- and low-iron trichomonads had increased and decreased ecto-5'-nucleotidase activity, respectively, among fresh isolates with activity detectable under normal medium conditions. Taking in account the high purine nucleotides levels present in vagina, the *T. vaginalis* site, the lack of cytolytic effects on parasites and the ecto-localization of enzymes involved on nucleotide hydrolysis, it is suggested that NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase modulate extracellular ATP, ADP and AMP concentrations. The final product, adenosine, is reuptake by salvage pathways.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA I.1. <i>Trichomonas vaginalis</i>	03
FIGURA I.2. Mapa metabólico simplificado do <i>Trichomonas vaginalis</i>	05
FIGURA I.3. Topografia de membrana das ectonucleotidasas.....	16
CAPÍTULO 1	
FIGURA 1.1. Effect of MgCl ₂ and CaCl ₂ concentration on 5'-nucleotidase activity in intact cells of 30236 strain (A) and 30238 strain (B).....	32
FIGURA 1.2. Effect of pH on 5'-nucleotidase activity in intact cells of 30236 strain (●) and 30238 strain (□).....	32
FIGURA 1.3. Dependence of 5'-nucleotidase activity on AMP concentrations in intact cells of 30236 strain (A) and 30238 strain (B).....	33
CAPÍTULO 2	
FIGURA 2.1. Effect of metronidazole (A) and tinidazole (B) on ATP, ADP and AMP hydrolysis in the 30236 strain	40
FIGURA 2.2. Effect of metronidazole (A) and tinidazole (B) on ATP, ADP and AMP hydrolysis in the POA-3 strain	41
FIGURA 2.3. Effect of metronidazole (A) and tinidazole (B) on ATP, ADP and AMP hydrolysis in the 30236 strain after 2 hours of cell treatment.....	41
FIGURA 2.4. Effect of metronidazole (A) and tinidazole (B) on ATP, ADP and AMP hydrolysis in the POA-3 strain after 2 hours of cell treatment.....	42
CAPÍTULO 3	
FIGURA 3.1.A-D Ultrastructural localization of NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase activities in intact cells of <i>T. vaginalis</i>	46

CAPÍTULO 4

- FIGURA 4.1.** NTPDase activity among fresh *T. vaginalis* isolates (nos. 1-5, part A and 7-10, part B) and a representative long-term-grown (no. 6) isolate.52
- FIGURA 4.2.** The extent of variation in the ecto-5'-nucleotidase activity among fresh *T. vaginalis* isolates and the long-term-grown 347 isolate.53
- FIGURA 4.3.** Representative experiments on the effect of growth of trichomonads in low- (center, hatched bars) versus high-iron (solid black bars) medium on NTPDase activity among two virus-minus (T016 and UT99-1) and two virus-harboring (UT99-6 and T068-II) fresh *T. vaginalis* isolates...
.....53
- FIGURA 4.4.** Effect of growth of trichomonads in low- (center, hatched bars) versus high-iron (solid black bars) medium on ecto-5'-nucleotidase activity among representative fresh *T. vaginalis* isolates and the long-term-grown 347 isolate.....54

CAPÍTULO 5 – B

- FIGURA 5.B.1.** Cromatografia em coluna de DEAE Affi-Gel Blue, onde foi aplicado o sobrenadante obtido da solubilização do homogenato com NP-40 a 0,1%78
- FIGURA 5.B.2.** Cromatografia em coluna de Concanavalina-A-Sepharose onde foi aplicado o *pool* das frações ativas 71-81 obtidas na cromatografia com coluna de DEAE Affi-Gel Blue79
- FIGURA 5.B.3.** SDS-PAGE das frações obtidas no processo de purificação da NTPDase de *T. vaginalis*80

FIGURA III.1. Esquema das vias de salvação de purinas em *T. vaginalis*, incluindo a NTPDase1 (nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase 1) e a ecto-5'-nucleotidase (5'-N)**91**

FIGURA III.2. Esquema das vias de salvação de purinas em *T. vaginalis*, incluindo a NTPDase1 (nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase1) e destacando a ausência da ecto-5'-nucleotidase (5'-N)**94**

FIGURA III.3. Esquema das vias de salvação de purinas em *T. vaginalis*, incluindo a NTPDase1 (nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase1) e destacando o efeito do ferro no aumento da atividade da ecto-5'-nucleotidase (5'-N)**95**

ÍNDICE DE TABELAS**CAPÍTULO 1**

TABELA 1.1. Substrate specificity of 5'-nucleotidase of *Trichomonas vaginalis*
.....**33**

TABELA 1.2. Effects of inhibitors on AMP hydrolysis by *Trichomonas vaginalis*
.....**33**

CAPÍTULO 5-A

TABELA 5.A.1. Iniciadores usados neste estudo**62**

CAPÍTULO 5-B

TABELA 5.B.1. Purificação da NTPDase de *Trichomonas vaginalis***77**

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACRs – *apyrase conserved regions*
- AP23 – *adhesion protein 23*
- AP33 – *adhesion protein 33*
- AP51 – *adhesion protein 51*
- AP65 – *adhesion protein 65*
- ADP – adenosina 5'-difosfato
- AIDS – *acquired immunodeficiency syndrome*
- AMP – adenosina 5'-monofosfato
- AMPC – adenosina 5'-monofosfato cíclico
- AMPCP – 5'-[α,β -metileno]difosfato
- Ap5A – P¹,P⁵-di(adenosina 5'-)pentafosfato
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- ATP – adenosina 5'-trifosfato
- CMP – citidina 5'-monofosfato
- ConA – concanavalina A
- DNA – *deoxyribonucleic acid*
- DST - doença sexualmente transmissível
- ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*
- E-NPP – ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
- E-NTPDase – ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
- FDA – *Food and Drug Administration*
- GMP – guanosina 5'-monofosfato
- GPI – glicosilfosfatidilinositol
- HIV – *human immunodeficiency virus*
- IMP – inosina 5'-monofosfato
- IFN- γ - interferon- γ
- IL-2 – interleucina-2
- PCR - *polymerase chain reaction*
- SDS-PAGE – dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida
- TLCK – *N- α -p-tosil-L-lisina clorometil cetona*

TYM – *trypticase – yeast extract - maltose*

UDP – uridina 5'-difosfato

UMP – uridina 5'-monofosfato

UTP – uridina 5'-trifosfato

I. INTRODUÇÃO

Trichomonas vaginalis é o protozoário flagelado causador da tricomonose (Kassai et al., 1988), a doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum no mundo. Apesar de o parasito ter sido descrito por Donné em 1836 (Honigberg, 1990) e do cultivo *in vitro* ter sido iniciado em 1920 (Linstead, 1990), muitos aspectos biológicos do protozário ainda são desconhecidos, o que revela a complexidade dos mecanismos utilizados pelo patógeno para a sobrevivência. O *T. vaginalis* utiliza diferentes mecanismos patogênicos para estabelecer o parasitismo com sucesso: a) o estabelecimento do parasito na vagina, um ambiente constantemente modificado pelas variações de pH, hormônios, menstruação e fornecimento de nutrientes; b) a citoaderência às células vaginais epiteliais através de adesinas, proteínas multifuncionais que apresentam também funções enzimáticas metabólicas; c) o escape das respostas imunes do hospedeiro e d) a alternância da expressão dos genes de virulência em resposta a fatores ambientais como ferro e cálcio (Alderete et al., 2002).

Nucleotídeos extracelulares estão envolvidos em uma variedade de funções fisiológicas e patológicas, incluindo contração do músculo liso, neurotransmissão, resposta imune, inflamação, agregação plaquetária e dor (Ralevic & Burnstock, 1998; Sitkovsky, 1998; Sneddon et al., 1999; Ding et al., 2000). Ectonucleotidases são enzimas envolvidas da degradação de nucleotídeos extracelulares e, desde a identificação do ATP em 1929, um grande número de enzimas foi caracterizado em plantas, bactérias, parasitos e em células de mamíferos, apresentando

envolvimento na sinalização celular (Plesner, 1995). Considerando o sério impacto da tricomonose na saúde pública, é importante estudar os aspectos bioquímicos do *T. vaginalis* que contribuem para infecção do hospedeiro e patogênese.

I.1. *Trichomonas vaginalis*

I.1.1. Aspectos morfológicos de *T. vaginalis*

O *T. vaginalis* apresenta um corpo celular muito plástico, adotando forma elipsóide, piriforme ou oval em preparações a fresco ou fixadas e coradas. Condições físico-químicas como pH, temperatura, tensão de oxigênio e força iônica afetam o aspecto dos organismos, que não possuem a forma cística, somente a trofozoítica. O *T. vaginalis* possui quatro flagelos anteriores, desiguais em tamanho, e uma membrana ondulante, que se adere ao corpo pela costa. O axóstilo é uma estrutura rígida e hialina, formada por microtúbulos, que se projeta através do centro do organismo, prolongando-se até a extremidade posterior. O núcleo é elipsóide, localizado próximo à extremidade anterior (Honigberg & Brugerolle, 1990) (Figura I.1).

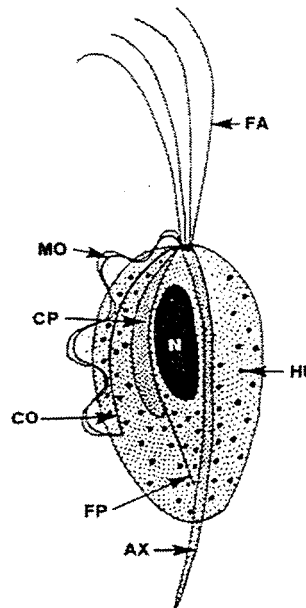


Figura. I.1. *Trichomonas vaginalis*. FA: flagelos anteriores; MO: membrana ondulante; CP: corpo parabasal; CO: costa; N: núcleo; FP: filamento parabasal; HI: hidrogenossomos; AX: axóstilo [De Carli, G.A. & Tasca, T. (2001a). Diagnóstico e identificação de parasitos. In: De Carli, G.A. Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. São Paulo: Atheneu, p. 663-723].

I.1.2. Aspectos bioquímicos de *T. vaginalis*

O *T. vaginalis* é um organismo eucariótico que difere da maioria das células eucarióticas em diversos aspectos significativos, principalmente nas exigências nutricionais e no metabolismo energético. O parasito depende de um grande número de metabólitos pré-formados como nutrientes, revelando a ausência das principais vias biossintéticas (Müller, 1990).

O protozoário é anaeróbio facultativo e pode ser cultivado *in vitro* na ausência de oxigênio, na faixa de pH compreendido entre 5,0 e 7,5 e em temperaturas entre 20 e 40°C (De Carli, 2000). O flagelado utiliza carboidratos como a glicose, a

maltose e a galactose como principal fonte de energia (Read, 1957), mas glicogênio e amido também podem manter o crescimento. Sacarose e manose não são utilizados (Müller, 1990). O *T. vaginalis* é capaz de manter o glicogênio em reserva, o qual representa até 20% do peso seco do organismo (Michaels & Treick, 1962). O protozoário também depende do fornecimento de aminoácidos ou proteínas digeridas, embora não exista informação disponível sobre a natureza essencial ou não essencial dos aminoácidos (Müller, 1990). O *T. vaginalis* não apresenta a capacidade de realizar síntese *de novo* de purinas e pirimidinas, sendo dependente das vias de salvação para a obtenção desses compostos (Heyworth et al., 1982; 1984). Os ácidos graxos saturados e insaturados e o colesterol também devem ser adquiridos do meio externo, devido à ausência da realização da sua biossíntese. As vitaminas, tais como tiamina, ácido nicotínico, ácido pantotênico e flavina são necessárias, bem como sais inorgânicos, entre os quais destaca-se uma acentuada utilização do ferro (Müller, 1990).

A principal característica dos tricomonas é que os torna alvo de estudos bioquímicos e fisiológicos é a ausência de mitocôndrias. O *T. vaginalis* apresenta hidrogenossomos, grânulos densos distribuídos por todo o citoplasma e especialmente concentrados próximos ao axóstilo e à costa (Müller, 1990; 1993; de Souza, 2002). Os hidrogenossomos são portadores de uma piruvato:ferredoxina oxidoreductase capaz de transformar o piruvato em acetato pela oxidação fermentativa e de liberar ATP e hidrogênio molecular (Figura I.2) (Kulda, 1999). Os principais produtos finais do metabolismo do *T. vaginalis* são glicerol, lactato, acetato, CO₂ e H₂, ocorrendo também a produção de malato e alanina (Müller,

1990). Os hidrogenossomos apresentam vesículas periféricas que atuam como sítios de reserva de cálcio (Benchimol & de Souza, 1983; de Souza & Benchimol, 1988). Os hidrogenossomos não contêm ácidos nucléicos; as proteínas são sintetizadas nos ribossomos citoplasmáticos livres e inseridas pós-translacionalmente nas organelas via seqüências indicadoras que estão ausentes nas proteínas maduras e que são similares às pré-seqüências mitocondriais (Johnson et al., 1993). Além do papel exercido no metabolismo energético dos tricomonas, os hidrogenossomos são as organelas responsáveis pela ativação dos 5-nitroimidazóis, fármacos usados no tratamento da tricomonose, dentre os quais o mais utilizado é o metronidazol.

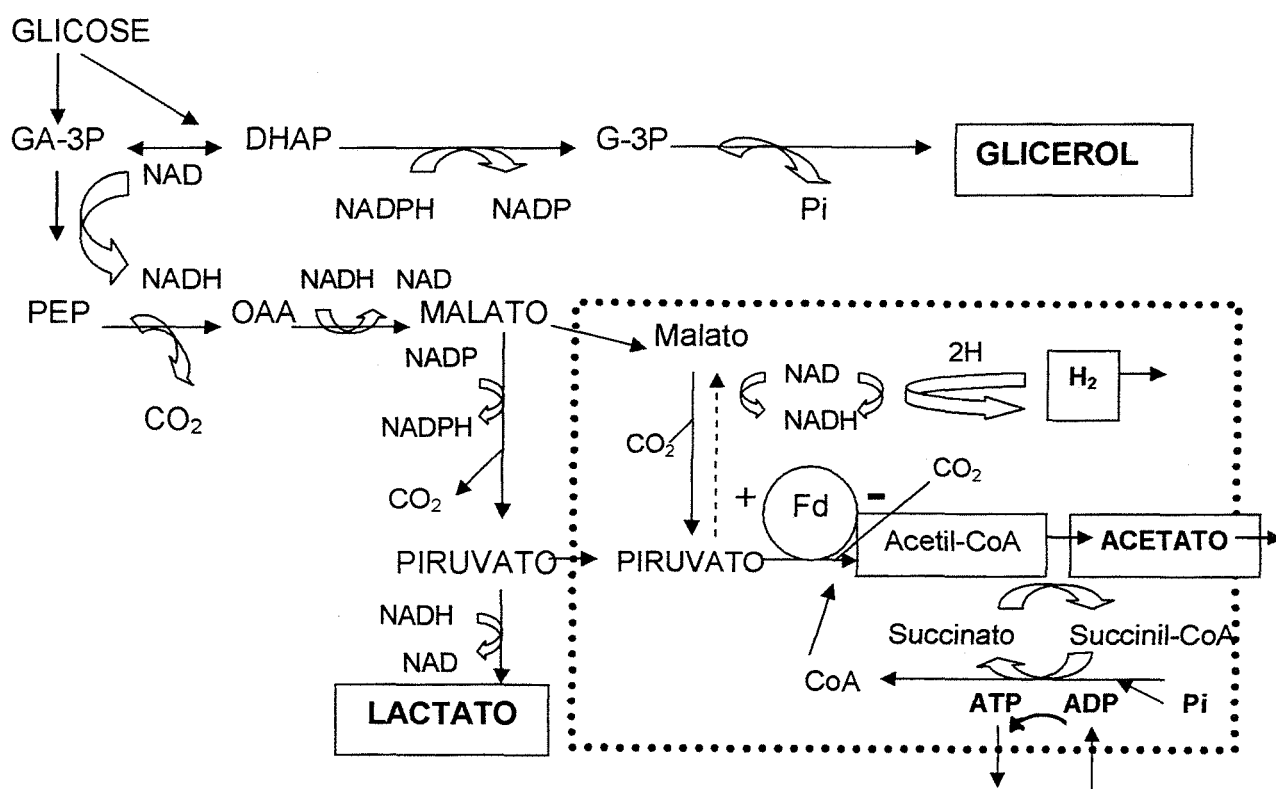


Figura I.2. Mapa metabólico simplificado do *Trichomonas vaginalis*. O quadrado com linhas pontilhadas representa um hidrogenossomo. GA-3P: gliceraldeído-3 fosfato; DHAP: diidroxiacetona fosfato; G-3P: glicerol-3 fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; OAA: oxaloacetato; Fd: ferredoxina [Adaptado de Kulda, J. (1999). *Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance*. International Journal for Parasitology 29: 199-212].

I.1.3. Tricomonose

A tricomonose caracteriza-se como uma DST de importante implicação médica, social e econômica. Existem 250 milhões de novos casos ocorrendo a cada ano mundialmente (Weinstock et al., 2004). Somente nos Estados Unidos, o *T. vaginalis* é responsável por 8 milhões de novas infecções anualmente (Cates, 1999). A incidência da infecção depende de vários fatores incluindo idade, atividade sexual, número de parceiros sexuais, outras DSTs, fase do ciclo menstrual, condições sócio-econômicas e técnicas de diagnóstico. A prevalência é alta entre os grupos de nível socioeconômico baixo, entre as pacientes de clínicas ginecológicas, pré-natais e em serviços de DSTs (Petrin et al., 1998).

As manifestações clínicas da tricomonose variam desde a apresentação assintomática até um estado de severa inflamação (vaginite) (Petrin et al., 1998). Setenta por cento das mulheres com vaginite aguda causada por *T. vaginalis* freqüentemente têm corrimento devido à infiltração por leucócitos. O sintoma clássico de corrimento amarelo, abundante, espumoso e mucopurulento, no entanto, ocorre em somente 10-20% das mulheres (Lehker & Alderete, 2000). Há também odor vaginal anormal e prurido vulvar. A vagina e a cérvix podem ser edematosas e eritematosas, com erosão e pontos hemorrágicos na parede cervical, conhecida como *colpitis macularis* ou cérvix com aspecto de morango. Embora essa aparência seja altamente específica para tricomonose, é vista somente em poucas mulheres (2-5%). Dor abdominal tem sido relatada entre muitas mulheres com tricomonose e pode ser indicativa de infecção do trato urogenital superior

(Rein, 1990; Petrin et al., 1998; Lehker & Alderete, 2000). Diferente das mulheres, homens infectados podem ter somente uma infecção auto-limitada (Krieger et al. 1993; Lehker & Alderete, 2000). A tricomonose em homens pode ser classificada em três grupos: um estado assintomático; um estado agudo, caracterizado por uretrite purulenta abundante; e doença sintomática leve, clinicamente indistingüível de outras causas de uretrite (Petrin et al., 1998). No estado sintomático há corrimento escasso, disúria, prurido, ulceração peniana e sensação de queimação imediatamente após a relação sexual. Complicações são raras mas podem incluir epididimite, infertilidade e prostatite (Holmes et al., 1975; Krieger, 1984; Krieger, 1990).

O *T. vaginalis* tem se destacado como um importante patógeno e está associado a sérias complicações de saúde. Estudos recentes mostraram que o *T. vaginalis* aumenta a susceptibilidade ao vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*) e a sua seqüela, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*) (Laga et al., 1993; Sorvillo & Kerndt, 1998; Sorvillo et al., 2001); é causa de baixo peso de recém-nascidos, bem como de nascimento prematuro (Cotch et al., 1991; 1997); predispõe mulheres à doença inflamatória pélvica atípica, câncer cervical e infertilidade (Grodstein et al., 1993; Zhang & Begg, 1994; Viikki et al., 2000). Entre outras seqüelas da tricomonose estão incluídas infecções do trato urinário e doença pulmonar crônica em recém-nascidos (Hoffman et al., 2003) e um caso de co-infecção por *T. vaginalis* e *Pneumocystis* sp. em um paciente aidético (Dubouguer et al., 2003). Homens infectados com HIV e *T. vaginalis* apresentam altos números

de partículas virais no sêmen, facilitando a transmissão do vírus (Hobbs et al., 1999). A tricomonose expande a porta de saída em pacientes infectados com HIV e a porta de entrada para pacientes não infectados pelo vírus (Sorvillo et al., 2001). Estima-se que 24% das infecções pelo HIV são diretamente atribuídas à tricomonose. Em estudo recente, Chesson et al. (2004) mostraram que a cada ano nos Estados Unidos, um número estimado de 746 novos casos de infecção pelo HIV entre mulheres pode ser atribuído aos efeitos facilitatórios da tricomonose na transmissão do vírus.

A interação *T. vaginalis*-hospedeiro é um processo complexo, no qual estão envolvidos componentes associados à superfície celular do parasito e às células epiteliais do hospedeiro e também componentes solúveis encontrados nas secreções vaginal e uretral. Esse patógeno atinge o parasitismo com sucesso através de vários mecanismos:

1. aquisição de nutrientes através de receptores específicos: a vagina é um dos mais complexos sítios de infecção para um patógeno de mucosa como o *T. vaginalis*, por estar constantemente sob a influência do ciclo menstrual. A ausência de enzimas para a síntese ou conversão de lipídios (Beach et al., 1990) é compensada pela ligação mediada por receptores e captação de lipoproteínas encontradas no soro ou em secreções vaginais (Peterson & Alderete, 1984) e por hemaglutinação específica (Lehker et al., 1990), seguida de hemólise mediada por proteases (Krieger et al., 1983; Dailey & Alderete, 1990). Além disso, o *T. vaginalis* requer grandes quantidades de ferro para crescimento e multiplicação (Gorrel, 1985) e para a regulação dos genes de virulência (Lehker et al., 1991; Lehker &

Alderete, 1992). Além da hemólise e da citotoxicidade estimularem o crescimento em ambientes ferro-restritivos, o parasito usa a lactoferrina, através de ligação a receptores específicos do patógeno (Lehker & Alderete, 1992) e o grupamento heme da hemoglobina como fontes de ferro (Alderete et al. 2004).

2. Citoaderência mediada pelas adesinas, proteínas multifuncionais: proteínas localizadas na superfície do *T. vaginalis* (AP23, AP33, AP51 e AP65) (Alderete & Garza, 1988) parecem interagir com as células do hospedeiro via interações do tipo receptor-ligante e têm sido caracterizadas como adesinas (Engbring et al., 1996). Essas proteínas são codificadas por famílias multi-gene (Alderete et al., 1995; 1998; Engbring & Alderete, 1998). É importante salientar que a análise das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos revelou semelhança das adesinas com enzimas metabólicas localizadas no hidrogenossomo (Engbring et al., 1996): a AP65 apresenta semelhança com a enzima málica e a AP51 e a AP33 com as subunidades α e β da succinil coenzima A sintetase (SCS), respectivamente (O'Brien et al., 1996; Engbring & Alderete, 1998; Alderete et al., 2001). A síntese dessas adesinas é regulada positivamente pela ligação a células epiteliais e ao ferro (Garcia et al., 2003). Imediatamente após o contato entre *T. vaginalis* e células vaginais epiteliais, os parasitos sofrem uma transformação morfológica dramática concomitante com a rápida síntese de adesinas e início da citoaderência (Arroyo et al., 1993).

3. Escape da resposta imune do hospedeiro:

3.1. através do revestimento da superfície dos parasitos com proteínas e macromoléculas do hospedeiro, evitando assim, o reconhecimento pelo sistema imune (Peterson & Alderete, 1982);

3.2. através da secreção de cisteína-proteinases que degradam imunoglobulinas e a porção C3 do complemento (Provenzano & Alderete, 1995). As proteinases dos tricomonas também são capazes de degradar o inibidor de protease leucocitária secretória, fator de proteção das mucosas contra patógenos e que desempenha um papel importante na prevenção da transmissão do HIV (Draper et al., 1998);

3.3. o peróxido de hidrogênio neutraliza as cisteína-proteinases, mostrando o efeito protetor da flora normal formada por lactobacilos. Entretanto, os lactobacilos são removidos imediatamente na infecção por *T. vaginalis*, através de fagocitose, e o parasito consegue neutralizar mais uma resposta imune do hospedeiro (Rendón-Maldonado et al., 1998).

4. Variação fenotípica: alternância da expressão de antígenos na superfície, com base na expressão no citoplasma versus superfície de um repertório de proteínas imunogênicas, entre as quais, a mais estudada é a P270 (Alderete et al., 1986; Alderete, 1987; Wang et al., 1987).

5. Alternância da expressão coordenada de genes de virulência em resposta a fatores ambientais, tais como concentrações de ferro e cálcio (Crouch et al., 2001; Alderete et al., 2002; Garcia et al., 2003).

O diagnóstico da tricomonose não pode ser baseado somente na apresentação clínica, pois a infecção poderia ser confundida com outras DSTs. A

investigação laboratorial é necessária e essencial para o diagnóstico da tricomonose uma vez que leva ao tratamento apropriado e facilita o controle da propagação da infecção (Petrin et al., 1998). Os métodos mais frequentemente empregados no diagnóstico da tricomonose apresentam relativamente baixa sensibilidade, como o exame direto a fresco e preparações coradas, conseqüentemente, a prevalência de infecção por *T. vaginalis* pode ser subestimada (Lehker & Alderete, 2000). O método de cultura é o padrão-ouro para o diagnóstico porque é simples de interpretar e requer somente 300-500 tricomonas/ml de inóculo para iniciar o crescimento. No entanto, são necessários alguns dias para a identificação do parasito, tempo durante o qual os pacientes infectados podem continuar a transmitir a infecção (De Carli, 1993; De Carli & Tasca, 2001; Petrin et al., 1998). O sistema de cultura *InPouchTV*, igualmente sensível como o método de cultura tradicional, apresenta baixo custo e eficiência (De Carli & Tasca, 2001b).

Uma alternativa seria primeiro fazer uma triagem pelo exame a fresco, que é relativamente fácil e rápido, seguido pela cultura das amostras que foram negativas pelo exame a fresco (Sorvillo et al., 2001). Quando o exame microscópico é positivo, a terapêutica apropriada poderá ser administrada ao paciente antes mesmo do resultado da cultura (De Carli, 2001). O advento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) tornou-se uma nova alternativa diagnóstica. Muitos testes com sensibilidade e especificidade próximas a 100% têm sido recentemente desenvolvidos (Lehker & Alderete, 2000).

Apesar disso, não é rotineiramente utilizado no laboratório clínico devido ao seu alto custo.

Várias técnicas baseadas na reação antígeno-anticorpo incluindo aglutinação, fixação do complemento, hemaglutinação indireta, difusão em gel, imunofluorescência (De Carli et al., 1992) e técnicas imunoenzimáticas (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) têm sido utilizadas para demonstrar a presença de anticorpos anti-tricomonas (Petrin et al., 1998). Contudo, a resposta por anticorpos depende de vários fatores, como a natureza do antígeno, forma livre ou inativa, concentração no local e duração da estimulação do sistema imune, não substituindo os exames parasitológico e cultural. Por isso, os testes imunológicos não são rotineiramente usados no diagnóstico dessa DST (De Carli, 2001).

Os fármacos mais utilizados no tratamento da tricomonose são metronidazol, tinidazol, ornidazol, nimorazol, canidazol, secnidazol e flunidazol (De Carli, 2000). Nos Estados Unidos, o metronidazol é o único aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e empregado no tratamento da tricomonose, sendo também a primeira escolha nos países da Europa, América Latina e Ásia (Petrin et al., 1998).

O metronidazol penetra na célula através de difusão e é ativado nos hidrogenossomos do *T. vaginalis*. Esse composto possui substituintes nitro e a ativação se dá pela redução desses grupos por ferredoxinas, encontradas somente em organismos anaeróbios, daí sua toxicidade seletiva (Kulda, 1999). Portanto, o metronidazol pode ser considerado um pró-fármaco pois requer ativação metabólica. A atividade antimicrobiana provavelmente resulta da formação de intermediários lábeis, quimicamente reativos, produzidos durante a redução do

grupo nitro. O mecanismo pelo qual os intermediários lábeis matam organismos susceptíveis ainda não está totalmente esclarecido (Mendz & Mégraud, 2002). Estudos mostram que eles destroem as células através de reações com macromoléculas intracelulares, tais como DNA, proteínas e membranas (Edwards, 1993; Tracy & Webster, 1996).

Muita atenção tem sido destinada aos relatos sobre um potencial carcinogênico devido ao fato de que o tratamento a longo prazo com altas doses de metronidazol possa induzir tumores nos pulmões de animais. Entretanto, dados clínicos sobre câncer provocado pelo uso de metronidazol são raros, e suas vantagens no tratamento da tricomonose sobrepõe-se aos seus riscos. Como todo antimicrobiano, o metronidazol não deve ser administrado indiscriminadamente e as doses devem ser mantidas as mais baixas possíveis (Rein, 1995). O metronidazol atravessa a barreira placentária e, por isso, não é indicado para o tratamento de mulheres infectadas que estejam no primeiro trimestre de gravidez (Petrin et al., 1998).

Embora o índice de cura seja excelente, freqüentemente ocorrem falhas no tratamento devido à reinfecção ou não adesão à terapia. Outras razões propostas são baixa absorção do fármaco, distribuição inefetiva do fármaco na região genital ou inativação por bactérias presentes na flora vaginal das pacientes (Petrin et al., 1998). Nas duas últimas décadas foram descritas 20 linhagens resistentes ao metronidazol na Europa (Bowden & Garnett, 1999). O tratamento desses casos é problemático, podendo necessitar de altas concentrações de metronidazol, aumentando o risco de toxicidade (Petrin et al., 1998). Devido à freqüência da

infecção na gravidez, à toxicidade do metronidazol e ao aparente desenvolvimento de isolados resistentes, alternativas terapêuticas aos 5-nitroimidazóis estão sendo pesquisadas (Lehker & Alderete, 2000).

I.2. Efeitos dos nucleotídeos extracelulares

Nucleotídeos podem ser encontrados nos espaços extracelulares em concentrações consideráveis e são principalmente liberados pelas células em situações fisiológicas de ativo metabolismo ou situações de estresse, anóxia ou lesão. Essas moléculas desempenham um papel regulatório importante, influenciando funções de muitos sistemas e órgãos (Chow et al., 1997). Os nucleotídeos e nucleosídeos púricos e pirimídicos são liberados durante ativação e agregação plaquetária, hemólise, injúria ao tecido, neurotransmissão (Cunha & Ribeiro, 2000), liberação de catecolaminas, exercícios físicos em demasia ou choque (Ferreira et al., 1995).

As purinas extracelulares desempenham importantes e diversos efeitos em muitos processos biológicos, desde organismos unicelulares até órgãos e sistemas. Esses efeitos incluem contração do músculo liso, neurotransmissão, secreção exócrina e endócrina, resposta imune, inflamação, agregação plaquetária, dor e modulação da função cardíaca (Ralevic & Burnstock, 1998). O ATP extracelular é uma molécula imuno-modulatória, envolvida na regulação da função de linfócitos por estimulação da secreção das citocinas interleucina 2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ) (Langston et al., 2003). Por outro lado, a adenosina pode agir como um agente anti-

inflamatório e, através da interação com receptores específicos, regula as conseqüências da inflamação (Cronstein et al., 1992; Bouma et al., 1997; Haskó & Cronstein, 2004).

Os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares podem agir como compostos sinalizadores por ligarem-se a receptores específicos, conhecidos como purinoceptores. Os receptores de adenosina, ou receptores P1, são divididos em 4 subtipos, A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, todos ligados a proteínas G. Os receptores P2 reconhecem ATP, ADP, UTP e UDP e são classificados em P2X, que são canais iônicos, e P2Y, receptores associados a proteínas G (Ralevic & Burnstock, 1998).

Evidências mostram que ambas purinas extracelulares e intracelulares apresentam propriedades citotóxicas. Filippini et al. (1990) demonstraram que a proteção contra os efeitos citolíticos do ATP extracelular é mediada por uma ecto-ATPase em linfócitos T. A citotoxicidade em células da micróglia também é mediada pelo ATP (Ferrari et al., 1997). Além disso, a adenosina apresenta papel modulatório na apoptose de astrócitos por duas vias: ativação dos receptores de adenosina A₃ e modulação da atividade da S-adenosil-L-homocisteína hidrolase (Dilorio et al., 2002). Da mesma forma, em parasitos atribui-se possíveis funções fisiológicas às enzimas envolvidas na degradação dos nucleotídeos, relacionadas à proteção dos efeitos citolíticos do ATP extracelular (Ferreira et al., 1995).

I.3. Ectonucleotidases

Os nucleotídeos extracelulares podem ser inativados por hidrólise via ectonucleotidases. Um número considerável de enzimas localizadas na superfície celular pode estar envolvido na via de hidrólise extracelular de nucleotídeos. Estas enzimas incluem a família E-NTPDase (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), a família E-NPP (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase), ecto-5'-nucleotidase e fosfatases alcalinas (Figura I.3) (Zimmermann, 2001).

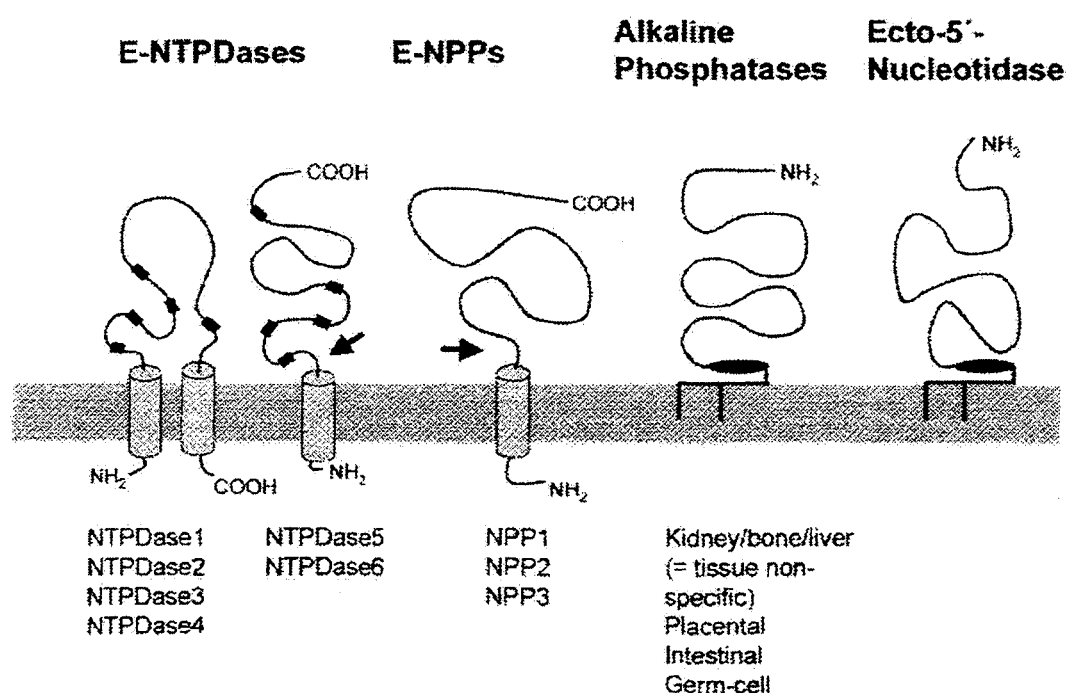


Figura I.3. Topografia de membrana das ectonucleotidases. As setas indicam os sítios de clivagem que produzem proteínas solúveis [Zimmermann, H. (2001). Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. Drug Development Research 52: 44-56].

I.3.1. Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases - NTPDases

Em mamíferos, oito membros da família E-NTPDase foram clonados e caracterizados funcionalmente. Existe similaridade do gene com espécies de invertebrados, plantas, leveduras e protozoários (Handa & Guidotti, 1996; Vasconcelos et al., 1996; Smith et al., 1997; Zimmermann 1999). Membros dessa família enzimática podem diferir consideravelmente apesar da identidade das seqüências. Entretanto, cinco seqüências de domínios altamente conservados (“regiões conservadas da apirase”, ACRs) são compartilhadas por todas as seqüências e tomaram-se um marcador das E-NTPDases (Handa & Guidotti, 1996). Provavelmente, as ACRs têm grande importância no sítio catalítico (Zimmermann, 2001).

Nas últimas duas décadas, a ocorrência de apirases tem sido descrita em plantas, insetos, parasitos e numa ampla variedade de tecidos de mamíferos, como sinaptossomas do sistema nervoso central e periférico, aorta bovina, células endoteliais e musculares (Sarkis et al., 1995). Considerando-se a ampla distribuição das apirases, tornou-se importante diferenciá-las da ATPase (NTPDase2) (Sarkis et al., 1995). Uma nova classificação utilizando a denominação nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) tem sido adotada baseada nas características bioquímicas e nas diferentes razões de hidrólise ATP:ADP (Zimmermann, 2001). Com exceção da NTPDase2, todos os outros membros da família E-NTPDase são considerados apirases.

A família E-NTPDase é composta por enzimas denominadas nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (NTPDase) e classificadas como NTPDase1 a 3 e -8, localizadas na superfície da célula e NTPDase4 a 7, situadas intracelularmente. Os sítios catalíticos dessas enzimas estão voltados para o meio extracelular ou para o lúmen de organelas intracelulares, tais como o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático ou lisossomos. A atividade máxima requer a presença de cátions divalentes, tais como cálcio ou magnésio e pH alcalino. As massas moleculares das enzimas glicosiladas estão na ordem de 70-80 KDa (Zimmermann, 2001; Shi et al., 2001; Bigonnesse et al., 2004).

As NTPDase1 a 3 e -8 estão localizadas na membrana plasmática com sítio ativo direcionado para o lado extracelular. Essas enzimas apresentam ampla especificidade a substratos, hidrolisando nucleosídeos 5'-di e 5'-trifosfatados, mas não apresentam hidrólise de nucleosídeos monofosfatados e compostos de éster de fosfato (glicose-6-fosfato, β -glicerolfosfato, *p*-nitrofenilfosfato, fosfoenolpiruvato e AMP cíclico) (Sarkis et al., 1995; Zimmerman, 2001). Os valores de K_m para ATP e ADP estão na ordem micromolar e o substrato preferido na maioria dos casos é Mg^{2+} -ATP (Zimmermann, 2001). A NTPDase1 (CD39, ecto-apirase, ecto-ATP difosfoidrolase, EC 3.6.1.5) apresenta uma razão de hidrólise ATP:ADP de 1:0,8, o que a diferencia da NTPDase2, uma ATPase com substancial preferência pelo ATP (razão de hidrólise ATP:ADP igual a 1:0,03) (Wang & Guidotti, 1996; Kirley, 1997; Zimmermann, 1999). Interessantemente, a NTPDase3 (HB6) é um intermediário funcional e hidrolisa ATP aproximadamente três vezes mais que ADP (Smith & Kirley, 1998). A NTPDase1, a NTPDase2 e a NTPDase3 formam complexos

oligoméricos de dímeros a tetrâmeros (Zimmerman, 2001). As NTPDases não são sensíveis aos inibidores clássicos das ATPases intracelulares do tipo-P, tipo-F e tipo-V ou fosfatases (Plesner, 1995), mas são inibidas por azida em concentrações de 10 a 20 mM (Sarkis et al., 1995).

A identificação molecular da NTPDase1 levou à descoberta de que a expressão da enzima coincide com a de CD39, um marcador de superfície de células ativadas do sistema imune, sugerindo um papel da enzima na proteção das células imunes dos efeitos líticos potenciais do ATP extracelular liberado pelas células alvos (Wang & Guidotti, 1996). Apesar de fatores limitantes como a baixa expressão nos tecidos e a perda de atividade quando solubilizadas em detergentes, apirases foram purificadas e seqüenciadas em diversos organismos e tecidos, tais como pâncreas de suínos (LeBel et al., 1980), raízes de ervilha (Vara & Serrano, 1981), batata (Handa & Guidotti, 1996), pulmões bovinos (Sévigny et al., 1997b), vasos sangüíneos (Sévigny et al., 1997a), coração bovino (Beaudoin et al., 1997), insetos (Valenzuela et al., 1998; Faudry et al., 2004), rins suínos (Lemmens et al., 2000), fígado de galinha (Knowles et al., 2002) e sinaptossomas de córtex de cérebro de suínos (Kukulski & Komoszynski, 2003).

A NTPDase4 compartilha sua estrutura geral com as NTPDase1-3, entretanto, as duas formas muito semelhantes da NTPDase4 humana revelam uma localização celular completamente diferente, localizadas no complexo de Golgi (UDPase) (Wang & Guidotti, 1998) e nos vacúolos lisossomais/autofágicos (Biederbick et al., 2000). De acordo com a nomenclatura previamente sugerida, elas deveriam ser denominadas NTPDase4 α (forma lisossomal/autofágica) e

NTPDase4 β (forma localizada no Golgi). Ambas hidrolisam nucleosídeos 5'-di e 5'-trifosfatados, mas ATP e ADP numa extensão menor do que os outros nucleotídeos. A NTPDase4 α apresenta preferência por UTP e TTP, enquanto CTP e UDP são os melhores substratos da NTPDase4 β (Zimmermann, 2001). O papel funcional da NTPDase4 α e da NTPDase4 β ainda não está definido, embora tenha sido sugerido que as isoenzimas regulam o nível de açúcar ativado na glicosilação de proteínas (Shi et al., 2001).

A NTPDase5 (CD39L4) e a NTPDase6 hidrolisam nucleosídeos difosfatados com uma maior preferência. A NTPDase5 está localizada no retículo endoplasmático e a NTPDase6 está associada ao complexo de Golgi, sugerindo uma localização intracelular (Zimmermann, 2001).

Shi et al. (2001) descreveram a clonagem, a localização e a caracterização de uma endo-apirase (*LALP1*) em humanos e camundongos, que pode ser considerada como NTPDase7 (Bigonnesse et al., 2004). O gene humano *LALP1* codifica uma proteína de 604 aminoácidos, enquanto o gene de camundongos *Lalp1* codifica uma seqüência de 606 aminoácidos. Ambas as seqüências, dos genes humano e de camundongo, apresentam 88% de identidade e considerável homologia com a hLALP70, uma endo-apirase lisossomal de mamíferos (Biederbick et al., 2000). A NTPDase7 hidrolisa preferencialmente os nucleosídeos trifosfatados UTP, GTP e CTP somente na presença de cálcio e apresenta uma localização intracelular (Shi et al., 2001).

Recentemente, uma NTPDase8 foi clonada e caracterizada, localizada na membrana plasmática de células de fígado, jejuno e rins de camundongos. A

NTPDase8 hidrolisa nucleosídeos 5'-di e 5'-trifosfatados, mas não hidrolisa AMP. Existe uma dependência absoluta da presença de cátions divalentes, principalmente cálcio, e de um valor ótimo de pH entre 5,5 e 8,0 para hidrólise de ATP e 6,4 para a hidrólise de ADP (Bigonnesse et al., 2004).

As NTPDases 1 a 8 compartilham similaridades e diferenças nas propriedades bioquímicas. As principais características que distinguem essas enzimas são a localização celular e a preferência por substratos, bem como a razão de hidrólise ATP:ADP. Devido à topologia de membrana, NTPDase1-3 e -8 são consideradas ecto-enzimas e defosforilam nucleotídeos no compartimento extracelular; por outro lado, NTPDase4 a 7 estão localizadas em organelas intracelulares e portanto, hidrolisam nucleotídeos no espaço intracelular. Independente da localização, as NTPDases estão envolvidas na degradação de nucleosídeos 5'-di e 5'-trifosfatados, e as diferenças na razão de hidrólise ATP:ADP determinam a razão nucleotídeos/nucleosídeos nos microambientes onde as enzimas estão localizadas, modulando a ativação dos purinoceptores.

Vários estudos têm relatado a presença de ectonucleotidases na superfície de parasitos. A nucleosídeo trifosfato hidrolase em *Toxoplasma gondii* foi uma das primeiras enzimas a ser descrita (Asai et al., 1983). Inicialmente, foi caracterizada com uma razão de hidrólise ATP:ADP de aproximadamente 5,0. Um estudo posterior demonstrou que diferentes isolados de *T. gondii* podem apresentar diferentes razões de hidrólise ATP:ADP, constituindo dois grupos: um grupo de isolados com razões de 4,0 a 5,0 e outro grupo, com razões de aproximadamente, 1,0 (Asai & Suzuki, 1990). Três ATPases foram identificadas em *T. vaginalis* (Turner

& Lushbaugh, 1991) e posteriormente foi realizada a caracterização de uma família de genes de ATPase do tipo-P (Shah et al., 2002). Uma ATP difosfoidrolase foi caracterizada (Vasconcelos et al., 1993), parcialmente purificada e imunolocalizada em *Schistosoma mansoni* (Vasconcelos et al., 1996). A regulação da concentração de nucleotídeos púricos em torno do parasito foi sugerida como função fisiológica, o que permitiria dano à homeostasia do hospedeiro por prevenir a ativação plaquetária ADP-induzida (Vasconcelos et al., 1993). Uma atividade de ecto-ATPase dependente de magnésio foi caracterizada em *Leishmania tropica* (Meyer-Fernandes et al., 1997) e em *Leishmania amazonensis* (Berrêdo-Pinho et al., 2001). Barros et al. (2000) caracterizaram uma atividade de ectonucleotídeo difosfoidrolase em *Entamoeba histolytica*, correlacionando alta atividade de hidrólise do ATP com virulência. Uma atividade de ecto-fosfatase foi caracterizada em *T. vaginalis*, apresentando localização na superfície e em vacúolos intracelulares do parasito (de Jesus et al., 2002). Coimbra et al. (2002) caracterizaram uma ATP difosfoidrolase e determinaram a localização na superfície de promastigotas de *Leishmania amazonensis*, sugerindo a participação da enzima na via de salvação de nucleosídeos, visto que o parasito não realiza síntese *de novo* de purinas e pirimidinas. Recentemente, uma nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase foi caracterizada em *Trypanosoma cruzi* através de imunoprecipitação com anticorpos anti-NTPase I de *Toxoplasma gondii* (Fietto et al., 2004). Curiosamente, tripomastigotas (formas infectantes do *T. cruzi*) apresentaram uma razão de hidrólise ATP:ADP de 2:1, enquanto epimastigotas (formas não infectantes)

apresentaram razão de hidrólise ATP:ADP igual a 1:1, sugerindo um possível papel da enzima nos mecanismos de virulência do parasito (Fietto et al., 2004).

As funções fisiológicas sugeridas para as NTPDases decorrem da regulação dos receptores purinérgicos que reconhecem ATP ou adenosina e da salvação de adenosina extracelular através da hidrólise seqüencial de ATP a AMP pelas NTPDases, posteriormente AMP à adenosina pela ecto-5'-nucleotidase e subsequente transporte através de transportadores de nucleosídeos (Handa & Guidotti, 1996). Através da degradação do ADP, as NTPDases inibem a agregação plaquetária ADP-induzida (Marcus et al., 1997). Além disso, o tratamento de linhagens de células B CD39-positivas com anticorpos monoclonais anti-CD39 induz adesão homotípica, sugerindo o envolvimento da enzima na adesão celular (Kansas et al., 1991).

A atividade da NTPDase1 foi caracterizada em *T. vaginalis* (Matos et al. 2001). A enzima hidroliza nucleosídeos da purina e da pirimidina 5'-di e 5'-trifosfatados em uma faixa de pH ótimo de 6,0 a 8,0. A atividade enzimática é cálcio-dependente e não é inibida pelos inibidores clássicos das ATPases, tais como ouabaína, *N*-etilmaleimida, ortovanadato e azida sódica (5 mM). Porém, uma inibição significativa da hidrólise do ADP é observada na presença de azida sódica na concentração de 20 mM, inibidor da NTPDase1. Levamisole, um inibidor específico de fosfatase alcalina, e P^{1},P^{5} -diadenosina 5'-pentafosfato (Ap5A), inibidor específico da adenilato quinase, também não inibiram a atividade de hidrólise. Os valores de K_m (Constante de Michaelis) para Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP encontram-se na ordem micromolar. O comportamento similar das atividades ATPásica e

ADPásica e o gráfico de Chevillard (Chevillard et al., 1993) sugerem que a hidrólise de ATP e ADP ocorre no mesmo sítio ativo. A presença de uma NTPDase1 em *T. vaginalis* pode ser importante para a modulação da razão nucleotídeos/nucleosídeos no meio extracelular, protegendo o parasito dos efeitos citolíticos dos nucleotídeos, principalmente ATP.

1.3.2. Ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5)

A ecto-5'-nucleotidase tem sido descrita em células bacterianas e vegetais e é vastamente distribuída nos tecidos de vertebrados (Zimmermann, 1992). Atualmente, somente um único gene foi identificado em vertebrados, mas variantes da glicosilação da enzima têm sido descritas (Zimmermann, 2001). Essa enzima é uma glicoproteína que catalisa a hidrólise de uma variedade de nucleosídeos 5'-monofosfatados tais como AMP, CMP, UMP, IMP e GMP. Geralmente, AMP é o nucleotídeo mais efetivamente hidrolisado, apresentando valores de K_m na ordem micromolar (Zimmermann, 1996). A atividade de 5'-nucleotidase é encontrada na forma solúvel citoplasmática e também na forma ligada à membrana, ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo esta forma localizada na superfície das células, contribuindo para a cascata que hidrolisa completamente ATP extracelular à adenosina. A ecto-5'-nucleotidase forma dímeros e o aparente peso molecular do monômero varia de 62 a 74 KDa (Zimmermann, 2001). Além das propriedades enzimáticas, a 5'-nucleotidase é uma proteína de superfície de linfócitos, CD73,

envolvida em adesão celular (Figura I.3) (Zimmermann, 1992; Airas et al., 1995; Zimmermann, 1996).

I.3.3. Localização citoquímica das ectonucleotidases

A determinação da localização celular das ectonucleotidases é importante para o conhecimento do comportamento dessas enzimas e das funções por elas exercidas. Em 1957, Wachstein & Meisel introduziram o método histoquímico para demonstração da atividade da nucleosídeo fosfatase em amostras de tecido através da microscopia. As amostras fixadas eram incubadas com substrato e chumbo; o fosfato liberado formava fosfato de chumbo e a posterior imersão das amostras em solução de sulfeto de amônio diluída revelava os sítios de atividade enzimática pelos depósitos negros de sulfato de chumbo. Estudos posteriores, incluindo microscopia eletrônica, foram empregados para determinar se o produto da reação, o fosfato, era formado no lado intra ou extracelular da membrana plasmática. A partir desses estudos, ficou estabelecido que a precipitação do fosfato de chumbo no lado externo da membrana celular compõe mais um critério para a caracterização de uma ecto-enzima (Plesner, 1995).

Diversos estudos mostraram a localização citoquímica de enzimas em *T. vaginalis*. A distribuição de uma ATPase foi demonstrada através da microscopia ótica (Sharma & Bourne, 1967). A microscopia eletrônica foi usada nos primeiros estudos de localização de atividades de nucleosídeo trifosfatase e fosfatase ácida em *T. vaginalis*, (Nielsen, 1974) e a imunolocalização empregando anticorpos

marcados com ouro foi empregada nos estudos de enzimas hidrogenossomais (Brugerolle et al., 2000). A distribuição histoquímica de uma ATP difosfoidrolase foi demonstrada em *Schistosoma mansoni* através de histoquímica enzimática ultraestrutural (Vasconcelos et al., 1993) e imunohistoquímica (Vasconcelos et al., 1996). O nosso grupo caracterizou e determinou a localização de uma ATP difosfoidrolase em membranas de sarcolema cardíaco de rato (Oliveira et al., 1997). A localização de uma ATP difosfoidrolase de promastigotas de *Leishmania amazonensis* (Coimbra et al., 2002) e de uma cálcio-ATPase expressa durante o ciclo eritrocítico do *Plasmodium falciparum* (Caldas & Wasserman, 2001) foi demonstrada através da citoquímica. Um estudo a respeito da localização citoquímica da ecto-5'-nucleotidase foi desenvolvido em *Toxoplasma gondii*, que se mostrou deficiente nessa atividade (Ngô et al., 2000). A localização citoquímica das ectonucleotidases é de fundamental importância para a compreensão da função desempenhada por essas enzimas em *T. vaginalis*.

I.4. Objetivos

Considerando o impacto da tricomonose na saúde pública com a geração de graves seqüelas como aumento da transmissão do HIV, do câncer cervical e de problemas relacionados à fertilidade e gestações, é de fundamental importância que se conheça os aspectos biológicos do *T. vaginalis*, incluindo as propriedades bioquímicas. A variedade de efeitos causados pelos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares ocorre em inúmeros tecidos e órgãos, principalmente em sítios de

infecção, onde há uma intensa liberação dessas moléculas das células em situação patológica.

O objetivo geral deste estudo foi realizar a caracterização bioquímica e determinar a localização das enzimas envolvidas na hidrólise extracelular de nucleotídeos em *T. vaginalis*, comparando isolados clínicos frescos e isolados cultivados por longos períodos no laboratório. A fim de se investigar a degradação extracelular de nucleotídeos em *T. vaginalis*, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Caracterizar a atividade de ecto-5'-nucleotidase em trofozoítos intactos de dois isolados de *T. vaginalis*, contribuindo para a hipótese da cascata enzimática que hidrolisa ATP até adenosina, formada pela NTPDase1 previamente caracterizada (Matos et al., 2001) e pela ecto-5'-nucleotidase.

2. Testar o efeito do metronidazol e do tinidazol, fármacos empregados no tratamento da tricomonose, nas atividades da NTPDase1 e da ecto-5'-nucleotidase de um isolado proveniente da ATCC (*American Type Culture Collection*) cultivado por longos períodos no laboratório e de um isolado clínico fresco de *T. vaginalis*.

3. Determinar a localização citoquímica da NTPDase1 e da ecto-5'-nucleotidase em trofozoítos intactos de *T. vaginalis* e avaliar a viabilidade celular dos parasitos na presença de diferentes concentrações de nucleotídeos e nucleosídeos da adenina.

4. Considerando a heterogeneidade encontrada em muitos aspectos biológicos do *T. vaginalis*, determinar a atividade da NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase em isolados clínicos frescos em comparação a isolados cultivados por longos períodos no laboratório bem como testar o efeito do ferro, modulador da expressão de genes de virulência em *T. vaginalis*, nas atividades dessas enzimas.

II. ARTIGOS CIENTÍFICOS

II.I. CAPÍTULO 1 - Tasca, T., Bonan, C.D., De Carli, G.A., Battastini, A.M., Sarkis, J.J. (2003). Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity from intact cells of *Trichomonas vaginalis*. **Experimental Parasitology** 105: 167-173.

Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity in intact cells of *Trichomonas vaginalis*

Tiana Tasca,^{a,b} Carla D. Bonan,^c Geraldo A. De Carli,^b
Ana M.O. Battastini,^a and João J.F. Sarkis^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600—Anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Parasitologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Pesquisa Bioquímica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 7 July 2003; received in revised form 2 September 2003; accepted 1 December 2003

Abstract

The enzymatic properties of an ecto-5'-nucleotidase were described in *Trichomonas vaginalis*. The enzyme hydrolyzes nucleoside monophosphates in optimum pH values of 7.5 and 6.5 for the 30236 strain and for the 30238 strain, respectively. Mg^{2+} and Ca^{2+} were activators of AMP hydrolysis in both strains. The apparent K_m (Michaelis constant) values for Mg^{2+} -AMP were $111.4 \pm 28.1 \mu M$ (mean \pm SD, $n = 3$) for 30236 strain and $420.2 \pm 35.7 \mu M$ (mean \pm SD, $n = 3$) for 30238 strain. The ecto-5'-nucleotidase activity was insensitive to levamisole and tetramisole, inhibitors of alkaline phosphatases, whereas α, β -methylene-ADP inhibited the enzymatic activity of both strains. Our results showed that the AMP hydrolysis presents differences in some kinetic parameters between the two strains investigated. An analysis of the enzymatic chain involved in the ATP hydrolysis to adenosine will contribute to understanding the biochemical aspects of the parasite and the mechanisms related to host–parasite interactions. © 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Index Descriptors and Abbreviations: *Trichomonas vaginalis*; Parasitic protozoan; Intact cells; Ecto-5'-nucleotidase; Adenosine; ATP, adenosine 5'-triphosphate; ADP, adenosine 5'-diphosphate; AMP, adenosine 5'-monophosphate; NTPDase1, nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (EC 3.6.1.5); NTPDase2, nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (EC 3.6.1.3); Ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5); CMP, cytidine 5'-monophosphate; UMP, uridine 5'-monophosphate; IMP, inosine 5'-monophosphate; GMP, guanosine 5'-monophosphate, K_m , Michaelis constant; V_{max} , maximum velocity; 3',5'-cAMP, adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate; NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide; $A_{p_n}A$, diadenosine polyphosphates; AMPCP, α, β -methylene adenosine diphosphate.

1. Introduction

The parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis* lives in the human urogenital tract. The parasite is a common cause of infection of the female tract and the annual incidence of trichomoniasis is more than 170 million cases worldwide (WHO, 1995). Trichomoniasis is a sexually transmitted disease (STD), and its clinical presentation ranges from a totally asymptomatic infection to a severe vaginitis. The clinical features of trichomoniasis in women are therefore limited to the urogenital

tract. In men, the infection is mostly asymptomatic, but in some cases it can lead to a mild urethritis, which usually resolves spontaneously within two weeks.

Although *T. vaginalis* is the most intensely studied trichomonad and is the world's most common cause of nonviral STDs, the exact mechanism of its pathogenesis has not been clearly elucidated (Brasseur and Savel, 1982; Petrin et al., 1998; Roussel et al., 1991). The host–parasite relationship is very complex, and the broad range of clinical symptoms cannot be easily attributed to a single pathogenic mechanism.

The proteins and glycoproteins on the cell surface of trichomonads plays a major role in cytoadhesion, host–parasite interaction, nutrient acquisition and in the

* Corresponding author. Fax: +55-51-3316-5530.

E-mail address: jj Sarkis@plug-in.com.br (J.J.F. Sarkis).

protection from the cytolytic effects (Petrin et al., 1998). Extracellular ATP may act as a signaling compound in cytolytic mechanisms (Filippini et al., 1990; Steinberg and Di Virgilio, 1991) and it is hydrolyzed to adenosine by a group of enzymes: NTPDase1 (apyrase, ecto-ATP diphosphohydrolase, CD39, EC 3.6.1.5) and NTPDase2 (ecto-ATPase, CD39L1, EC 3.6.1.3), which hydrolyze nucleoside di- and tri-phosphates, and the ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5), which hydrolyzes nucleoside monophosphates (Sarkis et al., 1995; Zimmermann, 1996b, 2001).

5'-Nucleotidase activity has been described for bacteria and plant cells and the enzyme is also widely distributed in vertebrate tissues (Zimmermann, 1992). This enzyme catalyzes the hydrolysis of a variety of nucleoside 5'-monophosphates such as AMP, CMP, UMP, IMP, and GMP. Generally, AMP is the most effectively hydrolyzed nucleotide, presenting K_m values in the lower micromolar range (Zimmermann, 1996b). 5'-Nucleotidase activity is found in a soluble form and also in a membrane-bound, ecto-surface-located form, which is one of the contributors to the cascade that completely hydrolyzes extracellular ATP to adenosine, and thus of major pharmacological interest. Ecto-5'-nucleotidase forms dimers and the apparent molecular weight of the monomer ranges from 62 to 74 kDa (Zimmermann, 2001). Beyond its enzymatic properties, 5'-nucleotidase is a lymphocyte surface protein CD73 and may be involved in cell adhesion (Zimmermann, 1992, 1996a).

Several studies have reported the presence of ecto-nucleotidases on the surface of parasites. Recently, we characterized an ATP diphosphohydrolase activity in *T. vaginalis* (Matos et al., 2001). Previous studies have demonstrated the presence of an ATP diphosphohydrolase on the external surface of the *Schistosoma mansoni* tegument (Vasconcelos et al., 1993, 1996). An ectonucleotide diphosphohydrolase was described in intact cells of *Entamoeba histolytica* (Barros et al., 2000) and a Mg-dependent ecto-ATPase activity has been described on the external surface of *Leishmania tropica* (Meyer-Fernandes et al., 1997) and in promastigotes of *Leishmania amazonensis* (Berrêdo-Pinho et al., 2001). More recently, an ATP diphosphohydrolase was characterized in promastigotes of *L. amazonensis* (Coimbra et al., 2002). However, 5'-nucleotidase has not been demonstrated in trichomonads. The present study describes the properties of an ecto-5'-nucleotidase activity in intact cells of two strains of *T. vaginalis*.

2. Materials and methods

2.1. Parasites and culture conditions

The 30236 and 30238 *T. vaginalis* strains from the American Type Culture Collection were used in this

study. Both strains were cultivated axenically in trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium (Diamond, 1957) without agar (pH 6.0) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated cold serum, penicillin (1000 IU/ml), and streptomycin sulphate (1 mg/ml) in aerobiosis at 37 °C (± 0.5). Isolates were subcultured every 48 h in TYM medium. Trichomonads in the logarithmic phase of growth and within 48 h of subculture (exhibiting more than 95% mobility and normal morphology) were harvested and washed with sterile saline solution (NaCl 0.85%) (750 g for 5 min) three times. Parasites were resuspended in saline solution and counted with a haemocytometer and adjusted to a concentration of 1.5×10^6 cells/ml, corresponding to 0.3–0.7 mg/ml protein. All experiments were performed using intact cells and cellular viability was assessed, before and after incubations, by mobility. The viability was not affected by incubation conditions.

2.2. Enzyme assays

Intact cells of 30236 and 30238 *T. vaginalis* strains were added to the reaction mixture containing 50 mM Tris buffer (pH 7.5, for 30236 strain and pH 6.5, for 30238 strain) and 3 mM MgCl₂ or CaCl₂. The samples were preincubated for 5 min at 37 °C in 200 μ l of the reaction mixture. The reaction was initiated by the addition of substrate (AMP or other as indicated) to a final concentration of 3 mM and stopped by adding 200 μ l 10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice for 10 min before assaying for the release of inorganic phosphate (Pi) (Chan et al., 1986). Incubation times and cellular density were chosen in order to ensure the linearity of the reactions. Controls with the addition of the intact cells after mixing trichloroacetic acid were used to correct non-enzymatic hydrolysis of substrates. Specific activity is expressed as nmol Pi released/h/ 1.5×10^6 cells. All samples were run in triplicate, with similar results achieved in at least three different cell suspensions.

2.3. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as standard.

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted by Student's *t* test, considering a level of significance of 5%.

3. Results

An enzyme with characteristics of an ecto-5'-nucleotidase was detected in intact cells of two *T. vaginalis*

strains. The time course for AMP hydrolysis occurring in both strains investigated was linear up to 90 min in the presence of Mg^{2+} or Ca^{2+} . Mg^{2+} -AMP hydrolysis increased as a function of cell density. The product formation was linear in the range of 0.8 – 2.0×10^6 cells/ml in the incubation medium (data not shown).

The 5'-nucleotidase activity was divalent cation-dependent and its sensitivity to Mg^{2+} and Ca^{2+} is demonstrated in Fig. 1. Mg^{2+} and Ca^{2+} were activators of AMP hydrolysis in both *T. vaginalis* strains (Figs. 1A,B). The activity was increased in the 30236 strain with magnesium concentrations of 5 and 8 mM (Fig. 1A), whereas, in these concentrations, a plateau was observed in the 30238 strain (Fig. 1B). Taking these results into account, the concentration of 3 mM magnesium, which is a classical activator of 5'-nucleotidase, was chosen for subsequent enzyme assays for both strains.

The AMP hydrolysis was evaluated by measuring pH dependence on activity in both strains. In the pH range

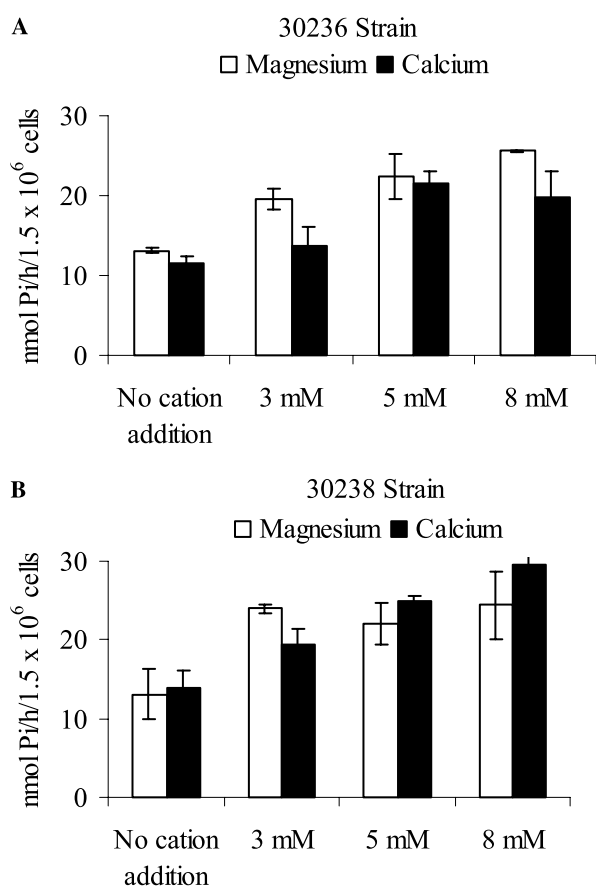


Fig. 1. Effect of $MgCl_2$ and $CaCl_2$ concentration on 5'-nucleotidase activity in intact cells of 30236 strain (A) and 30238 strain (B). Open bars represent 5'-nucleotidase activity in presence of $MgCl_2$ and closed bars, in presence of $CaCl_2$. Incubation conditions are described in Section 2. The control group was incubated without the addition of cation. Bars represent the mean \pm SD of three different determinations using different cells suspensions, each in triplicate.

of 5.5–8.5, where the cells were alive throughout the time course of reaction, the 5'-nucleotidase activity progressively increased to reach a maximal level at pH 6.5, for the 30238 strain, and pH 7.5, for the 30236 strain (Fig. 2).

Mg^{2+} -AMP hydrolysis was determined at substrate concentrations in the range of 100–3000 μ M. The enzyme activity increased with increasing concentrations of the nucleotide (Mg^{2+} fixed at 3 mM with variable concentrations of AMP). K_m (Michaelis constant) and V_{max} (maximum velocity) values of intact cells samples of both *T. vaginalis* strains were estimated from the Eadie–Hofstee plot with three different enzyme preparations (Figs. 3A,B). The apparent K_m values for Mg^{2+} -AMP were $111.4 \pm 28.1 \mu$ M (mean \pm SD, $n = 3$) for the 30236 strain and $420.2 \pm 35.7 \mu$ M (mean \pm SD, $n = 3$) for the 30238 strain. The V_{max} values for Mg^{2+} -AMP were 6.5 ± 2.4 and 12.9 ± 2.3 nmol Pi/h/ 1.5×10^6 cells (mean \pm SD, $n = 3$) for the 30236 and the 30238 strains, respectively.

Ecto-5'-nucleotidase has been described as an enzyme with a broad substrate monophosphate specificity and a preference for AMP (Zimmermann, 1996a). All nucleoside monophosphates tested were hydrolysed at a lower rate than AMP by intact cells of both strains, except GMP, which was hydrolyzed at a higher rate than AMP by 30238 the strain (Table 1).

To discard the influence of other enzymes, such as alkaline phosphatase, in the AMP hydrolysis, inhibitors of this enzyme were tested. Levamisole and tetramisole, specific alkaline phosphatase inhibitors, had no effect upon AMP hydrolysis in both strains of *T. vaginalis* (Table 2). Conversely, the known 5'-nucleotidase inhibitor, adenosine 5'-[α,β -methylene]diphosphate (AMPCP)

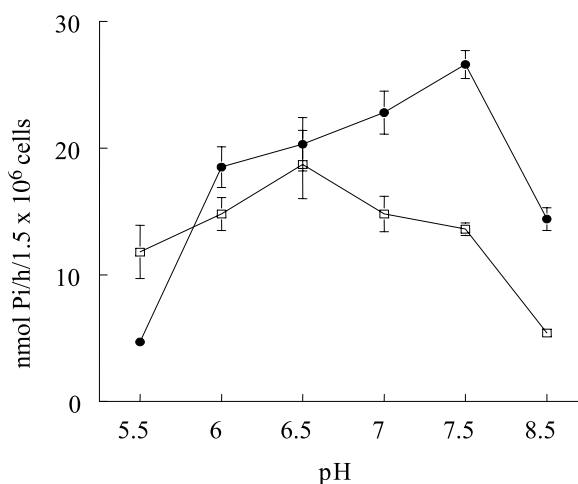


Fig. 2. Effect of pH on 5'-nucleotidase activity in intact cells of 30236 strain (●) and 30238 strain (□). Incubation conditions are described in Section 2, in presence of $MgCl_2$ 3 mM. In this pH range (5.5–8.5), the cells were viable throughout the course of the experiments. Data are means \pm SD of three determinations with different cell suspensions.

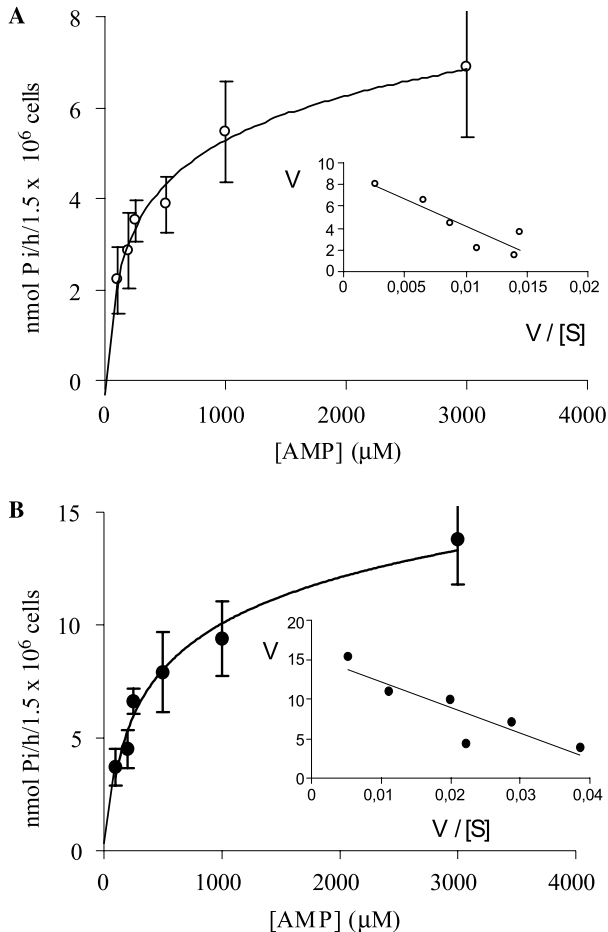


Fig. 3. Dependence of 5'-nucleotidase activity on AMP concentrations in intact cells of 30236 strain (A) and 30238 strain (B). Incubation conditions are described in Section 2, in presence of MgCl_2 3 mM. Data are means \pm SD of three determinations with different cell suspensions. Insets: Eadie-Hofstee plots for AMP in both strains. V, velocity of 5'-nucleotidase activity, expressed in nmol Pi/h/ 1.5×10^6 cells; V/[S], velocity/substrate concentration (AMP).

Table 1
Substrate specificity of 5'-nucleotidase of *T. vaginalis*^a

Substrate	Relative activity	
	30,236 strain	30,238 strain
AMP	1.00 \pm 0.15	1.00 \pm 0.11
CMP	0.09 \pm 0.02	0.50 \pm 0.09
GMP	0.67 \pm 0.18	1.40 \pm 0.13
UMP	0.03 \pm 0.002	0.50 \pm 0.04

^a Results are expressed as the mean \pm SD for at least four experiments. All substrates were used at 3 mM (3 mM Mg^{2+}). Control 5'-nucleotidase activity was 8.8 and 16.9 nmol Pi/h/ 1.5×10^6 cells for the 30236 and 30238 strains, respectively.

was also tested and inhibited the enzyme activity in both strains (Table 2).

The possibility that the AMP hydrolyzed by 5'-nucleotidase could be originated from a phosphodiesterase must be ruled out since the released Pi should be a

Table 2
Effects of inhibitors on AMP hydrolysis by *T. vaginalis*^a

Inhibitor	Concentration (mM)	% Control enzyme activity	
		30,236 strain	30,238 strain
Levamisole	1	140 \pm 11*	109 \pm 25
Tetramisole	1	110 \pm 21	102 \pm 20
AMPCP	0.2	53 \pm 9*	69 \pm 7*

* Significant difference from control activity (100%) by Student's *t* test ($P < 0.05$).

^a Control 5'-nucleotidase activity was 7.9 \pm 0.4 and 19.9 \pm 1.0 nmol Pi/h/ 1.5×10^6 cells for 30236 and 30238 strains, respectively. Results are expressed as percentage of control activity (100%). AMP was used at 3 mM (3 mM Mg^{2+}). Data represent the means \pm SD for at least four experiments and were analysed statistically by Student's *t* test.

superestimated amount. Thus, to avoid the influence of a phosphodiesterase, cyclic AMP, substrate for this enzyme, was incubated with the intact cells and the activity was tested. The control activity was 6.0 \pm 1.7 and 14.9 \pm 0.7 nmol Pi/h/ 1.5×10^6 cells (mean \pm SD, $n = 3$) for the 30236 and 30238 strains, respectively, whereas the activity in the presence of cyclic AMP (3 mM) was 5.5 \pm 1.3 and 14.4 \pm 2.0 nmol Pi/h/ 1.5×10^6 cells (mean \pm SD, $n = 3$) for the 30236 and 30238 strains, respectively. Hence, the interference of a phosphodiesterase could be excluded in both *T. vaginalis* strains, given that the activity in the presence of cyclic AMP was lower than the control activity, showing no AMP production from phosphodiesterase activity. The kinetic data strongly suggest that the AMP hydrolysis characterized here is due to a true ecto-5'-nucleotidase activity in both *T. vaginalis* strains.

4. Discussion

In this study, we report the properties of an ecto-5'-nucleotidase activity present on the external surface of intact cells of *T. vaginalis*. Cellular integrity and viability were assessed, before and after the reactions, by the mobility of the trophozoites. The integrity of the cells was not affected by any of the conditions used in the assays. Enzyme activity does not depend on added divalent cations, but it can be increased by the addition of millimolar concentrations of Mg^{2+} and Ca^{2+} (Zimmermann, 1992). In the ecto-5'-nucleotidase activity of *T. vaginalis*, Mg^{2+} and Ca^{2+} were activators (Figs. 1A,B). The K_m values vary to some extent between cell type and preparation, generally they are in the lower micromolar range (Zimmermann, 1996a). For both *T. vaginalis* strains investigated, the apparent K_m values for Mg^{2+} -AMP were 111.4 \pm 28.1 μM (mean \pm SD, $n = 3$) for 30236 strain and 420.2 \pm 35.7 μM (mean \pm SD, $n = 3$) for 30238 strain. The characteristic broad substrate monophosphates specificity of ecto-5'-nucleotidase was also observed in both strains studied, with a preference

for AMP in the 30236 strain and for GMP in the 30238 strain (Table 1).

Nucleoside 5'-monophosphates are subject to hydrolysis by alkaline phosphatases in addition to ecto-5'-nucleotidase and presumably also by some members of the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) family (Zimmermann, 2001). The influence of contaminating alkaline phosphatases on AMP hydrolysis in our assay conditions was excluded since 1 mM levamisole and tetramisole, classical alkaline phosphatases inhibitors, did not affect the AMP hydrolysis in both *T. vaginalis* strains investigated (Table 2). The members of the E-NPP family reveal alkaline phosphodiesterase as well as nucleotide pyrophosphatase activity, which are properties of the same enzyme molecule. They have comparable catalytic properties and are capable of hydrolyzing 3',5'-cAMP to AMP, ATP to AMP and P_i, ADP to AMP, and P_i, NAD⁺ to AMP and nicotinamide mononucleotide, and the diadenosine polyphosphates Ap_nA (Zimmermann, 2001). The possibility of a phosphodiesterase interference in our experiments can be ruled out since we incubated cyclic AMP with the intact cells and the activities of the 30236 and 30238 strains were not higher than control activity. These results indicate that the hydrolysis observed correspond to the AMP added to the incubation medium, and not to AMP derived from a phosphodiesterase reaction. The ecto-5'-nucleotidase of vertebrates is competitively inhibited by the nucleotide analogue adenosine 5'-[α,β -methylene]diphosphate (AMPCP). Our results showed that the inhibition was observed also in both *T. vaginalis* strains (Table 2).

Nucleotides are released from dying or destroyed cells under physiological or pathological conditions after massive injury (Ralevic and Burnstock, 1998). ATP is known to be an important extracellular signaling molecule which is supposed to increase the plasma membrane permeability and has important effects on cell membrane properties (Steinberg and Di Virgilio, 1991). Extracellular ATP may be one of the signaling molecules involved in cell-mediated cytotoxicity (Filippini et al., 1990). It has been demonstrated that extracellular ATP has profound effects on cellular functions, causing plasma membrane depolarization, Ca²⁺ influx, and cell death (Filippini et al., 1990; Steinberg and Di Virgilio, 1991). Filippini et al. (1990) have shown that ATP can kill different cells, with the exception of cells that express a high level of ATP-breakdown activity on their surface. Extracellular ATP is hydrolyzed to adenosine by a group of enzymes: the NTPDase1, that hydrolyzes nucleoside di- and triphosphates, and the 5'-nucleotidase, able to hydrolyze nucleoside monophosphates. Taking into account the fact that the NTPDase1 was discussed in *T. vaginalis* (Matos et al., 2001), the ecto-5'-nucleotidase described here would thus represent the final step of the enzymatic chain which leads from the extracel-

lular trinucleotide to the nucleoside. Reuptake of the nucleoside would then serve the salvage of released nucleotides (Zimmermann, 1992).

In animals, the ecto-5'-nucleotidase is present in practically all tissues, but not on all cell types. The cell- or tissue-specific physiological consequences of ATP-elimination and/or adenosine production vary, since both ATP and adenosine induce receptor-mediated physiological functions (Zimmermann, 1992). Extracellular ATP has several effects on many biological processes, including immune response, inflammation, platelet aggregation and pain (Ding et al., 2000; Ralevic and Burnstock, 1998; Sitkovsky, 1998; Sneddon et al., 1999). Adenosine induces vasodilation, a decrease in glomerular filtration rate, inhibition of neurotransmitter release, inhibition of the immune and inflammatory response or lipolysis. In more primitive organisms, the bacterial 5'-nucleotidase has an ecological function in nutrient recycling in aqueous habitats (Zimmermann, 1992).

The presence of enzymes performing ATP, ADP (Matos et al., 2001), and AMP hydrolysis in trichomonads may be important for the modulation of nucleotide concentration in the extracellular space, protecting the parasite from the cytolytic effects of the nucleotides, mainly ATP. In addition, *T. vaginalis* lacks the ability to synthesize purines and pyrimidines de novo and its growth and survival is dependent of salvage pathways to generate nucleotides (Heyworth et al., 1982, 1984). Purine salvage is mediated by nucleoside phosphorylases and kinases (Miller and Lindstead, 1983), whereas phosphoribosyltransferases and nucleoside kinases are able to recover pyrimidines (Wang and Cheng, 1984). Thus, these enzymes can be regarded as potential targets for anti-*T. vaginalis* chemotherapy (Wang, 1990).

The enzymatic chain present in *T. vaginalis* which hydrolyzes extracellular nucleotides may contribute to escape mechanisms of the parasite by breaking down ATP and providing the adenosine required for parasite growth. Furthermore, the 30236 and 30238 strains investigated are virulent and present differences in some kinetic parameters of 5'-nucleotidase activity. The 30238 strain presented higher ecto-5'-nucleotidase activity when compared with the 30236 strain. Many studies have found strain variability in *T. vaginalis* expressed in variability of virulence, antigenic properties, geographic distribution, and isoenzyme analysis (Alderete, 1983, 1985; Christian et al., 1963; Farris and Honigberg, 1970; Hogue, 1943; Kotcher and Hoogasian, 1957; Kott and Alder, 1961; Krieger et al., 1985; Kulda, 1967; Teras, 1966; Torian et al., 1984). The clear identification of the physiological significance of these enzymes in the intracellular and extracellular environment of *T. vaginalis* could contribute to understanding biochemical aspects of the parasite and the mechanisms involved in specific host-parasite interactions. In addition, the

ecto-5'-nucleotidase could be considered a potential drug target for anti-trichomonad chemotherapy.

Acknowledgments

Grateful thanks to Dr. Sérgio De Meda Lamb, Pharmacy School (PUCRS) Chairman for his support and to Iveli Rosset and Paola Tessele for technical assistance. This work was partially supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Third World Academy of Science (TWAS). T.T. is recipient of a CNPq fellowship.

References

- Alderete, J.F., 1983. Antigen analysis of several pathogenic strains of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 39, 1041–1047.
- Alderete, J.F., Suprun-Brown, L., Kasmala, L., Smith, J., Spence, M., 1985. Heterogeneity of *Trichomonas vaginalis* and discrimination among trichomonal isolates and subpopulations with sera of patients and experimentally infected mice. *Infect. Immun.* 49, 463–468.
- Barros, F.S., De Menezes, L.F., Pinheiro, A.A.S., Silva, E.F., Lopes, A.H.C.S., De Souza, W., Meyer-Fernandes, J.R., 2000. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Biochem. Biophys.* 375, 304–314.
- Berrêdo-Pinho, M., Peres-Sampaio, C.E., Chrispim, P.P.M., Belmont-Firpo, R., Lemos, A.P., Martiny, A., Vannier-Santos, M.A., Meyer-Fernandes, J.R., 2001. A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Arch. Biochem. Biophys.* 391, 16–24.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 218–254.
- Brasseur, P., Savel, J., 1982. Evaluation de la virulence des souches de *Trichomonas vaginalis* par l'étude de l'effet cytopathogène sur culture des cellules. *C. R. Soc. Biol.* 176, 849–860.
- Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375–380.
- Christian, R.T., Miller, N.F., Ludovici, P.P., Riley, G.M., 1963. A study of *Trichomonas vaginalis* in human cell culture. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 85, 947–954.
- Coimbra, E.S., Gonçalves-da-Costa, S.C., Corte-Real, S., de Freitas, F.G.R., Durão, A.C., Souza, C.S.F., Silva-Santos, M.I., Vasconcelos, E.G., 2002. Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitology* 124, 137–143.
- Diamond, L.S., 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 43, 488–490.
- Ding, Y., Cesare, P., Drew, L., Nikitaki, D., Wood, J.N., 2000. ATP, P2X receptors and pain pathways. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 289–294.
- Farris, V.K., Honigberg, B.M., 1970. Behavior and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* Donné in chick liver cell cultures. *J. Parasitol.* 56, 849–882.
- Filippini, A., Taffs, R.E., Agui, T., Sitkovsky, M.V., 1990. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. *J. Biol. Chem.* 265, 334–340.
- Heyworth, P.G., Gutteridge, W.E., Ginger, C.D., 1982. Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett.* 141, 106–110.
- Heyworth, P.G., Gutteridge, W.E., Ginger, C.D., 1984. Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett.* 176, 55–60.
- Hogue, M.J., 1943. The effect of *Trichomonas vaginalis* on tissue culture cells. *Am. J. Hyg.* 37, 142–152.
- Kotcher, E., Hoogasian, A.C., 1957. Cultivation of *Trichomonas vaginalis* Donné, 1837, in association with tissue cultures. *J. Parasitol.* 43, 39.
- Kott, H., Alder, S., 1961. A serological study of *Trichomonas vaginalis* sp. parasitic in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 55, 333–344.
- Krieger, J.N., Holmes, K.K., Spence, M.R., Rein, M.F., McCormack, W.M., Tam, M.R., 1985. Geographic variation among isolates of *Trichomonas vaginalis*: demonstration of antigenic heterogeneity by using monoclonal antibodies and indirect immunofluorescence technique. *J. Infect. Dis.* 152, 979–984.
- Kulda, J., 1967. Effect of different species of trichomonads on monkey kidney cell cultures. *Folia Parasitol.* 14, 295–310.
- Matos, J.A.A., Borges, F.P., Tasca, T., Bogo, M.R., De Carli, G.A., Fauth, M.G., Dias, R.D., Bonan, C.D., 2001. Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Parasitol.* 31, 770–775.
- Meyer-Fernandes, J.R., Dutra, P.M.L., Rodrigues, C.O., Saad-Nehme, J., Lopes, A.H.C.S., 1997. Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. *Arch. Biochem. Biophys.* 341, 40–46.
- Miller, R.L., Lindstead, D., 1983. Purine and pyrimidine metabolizing activities in *Trichomonas vaginalis* extracts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 7, 41–51.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., Garber, G., 1998. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 300–317.
- Ralevic, V., Burnstock, G., 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413–492.
- Roussel, F., De Carli, G., Brasseur, P., 1991. A cytopathic effect of *Trichomonas vaginalis* probably mediated by a mannose/n-acetylglucosamine binding lectin. *Int. J. Parasitol.* 21, 941–944.
- Sarkis, J.J.F., Battastini, A.M.O., Oliveira, E.M., Frassetto, S.S., Dias, R.D., 1995. ATP diphosphohydrolases: an overview. *J. Braz. Assoc. Adv. Sci.* 47, 131–136.
- Sitkovsky, M.V., 1998. Extracellular purines and their receptors in immunoregulation. Review of recent advances. *Nippon Ika Dai-gaku Zasshi* 65, 351–357.
- Sneddon, P., Westfall, T.D., Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S., Westfall, D.P., Kennedy, C., 1999. Modulation of purinergic neurotransmission. *Prog. Brain Res.* 120, 11–20.
- Steinberg, T.H., Di Virgilio, F., 1991. Cell-mediated cytotoxicity: ATP as an effector and the role of target cells. *Curr. Opin. Immunol.* 3, 71–75.
- Teras, J.K., 1966. Differences in the antigenic properties within strains of *Trichomonas vaginalis*. *Wiad. Parazytol.* 12, 357–363.
- Torian, B.E., Connelly, R.J., Stephens, R.S., Stibbs, H.H., 1984. Specific and common antigens of *Trichomonas vaginalis* detected by monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 43, 270–275.
- Vasconcelos, E.G., Nascimento, P.S., Meirelles, M.N.L., Verjovski-Almeida, S., Ferreira, S.T., 1993. Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase on the external surface of tegument of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 205–214.
- Vasconcelos, E.G., Ferreira, S.T., Carvalho, T.M.U., De Souza, W., Kettlun, A.M., Mancilla, M., Valenzuela, M.A., Verjovski-Almeida, S., 1996. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 271, 22139–22145.
- Wang, C.C., Cheng, H., 1984. Salvage of pyrimidine nucleotides by *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 10, 171–184.

- Wang, C.C., 1990. Nucleic acid metabolism in *Trichomonas vaginalis*. In: Honigberg, B.M. (Ed.), *Trichomonads Parasitic in Humans*. Springer-Verlag, New York, pp. 84–90.
- World Health Organization, 1995. An overview of selected curable sexually transmitted diseases, in: World Health Organization, *Global Program on AIDS*, Geneva, Switzerland, pp. 2–27.
- Zimmermann, H., 1992. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285, 345–365.
- Zimmermann, H., 1996a. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49, 589–618.
- Zimmermann, H., 1996b. Extracellular purine metabolism. *Drug Dev. Res.* 39, 337–352.
- Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52, 44–56.

II.2. CAPÍTULO 2 - Tasca, T., Borges, F.P, Bonan, C.D., De Carli, G.A., Battastini, A.M., Sarkis, J.J. (2003). Effects of metronidazole and tinidazole on NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase from intact cells of *Trichomonas vaginalis*. **FEMS Microbiology Letters** 226: 379-384.

Effects of metronidazole and tinidazole on NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase from intact cells of *Trichomonas vaginalis*

Tiana Tasca ^{a,b}, Fernanda Pires Borges ^b, Carla Denise Bonan ^c,
Geraldo Attilio De Carli ^b, Ana Maria Oliveira Battastini ^a, João José Freitas Sarkis ^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600 - Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Parasitologia Clínica, Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Pesquisa Bioquímica, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 17 July 2003; accepted 11 August 2003

First published online 2 September 2003

Abstract

Here we report the effects of metronidazole and tinidazole on NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase from intact cells of *Trichomonas vaginalis*. Adenosine triphosphate (ATP) and adenosine diphosphate (ADP) hydrolysis was 5- to 7-fold higher for the fresh clinical strain, when compared with the ATCC (American Type Culture Collection) strain. ATP hydrolysis was activated in the presence of metronidazole in the ATCC strain, whilst it was inhibited 33% by 50 μ M tinidazole in a fresh clinical isolate. The treatment of cells in the presence of metronidazole for 2 h inhibited ATP and ADP hydrolysis, whilst treatment with tinidazole inhibited ATP and ADP hydrolysis only in the fresh clinical isolate. The drugs did not change the ecto-5'-nucleotidase activity for both strains. Our results suggest that the modulation of extracellular ATP and ADP levels during treatment with these drugs could be a parasitic defence strategy as a survival mechanism in an adverse environment.

© 2003 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: NTPDase1; Ecto-5'-nucleotidase; Metronidazole; Tinidazole; *Trichomonas vaginalis*

1. Introduction

Trichomonas vaginalis is emerging as a major pathogen in men and women and is associated with serious health consequences [1]. Trichomoniasis is now the most common non-viral sexually transmitted disease in the world [2]. Recent publications show that *T. vaginalis* promotes the transmission of human immunodeficiency virus (HIV) [3,4], causes low-weight and premature birth [5], predisposes women to atypical pelvic inflammatory disease [6], cervical cancer [7–9] and infertility [10]. *T. vaginalis* possesses multiple mechanisms for colonisation of the vaginal tract and achieves successful host parasitism through var-

ious mechanisms including: (1) acquisition of nutrients through specific receptors; (2) contact with the vaginal epithelium where four iron-regulated surface proteins mediate cytoadherence to the vaginal epithelial cells; (3) evasion of immune responses; (4) alternating surface expression of at least two antigen repertoires; and (5) alternate and coordinate expression of virulence genes in response to host environmental factors [11]. Indeed, the proteins and glycoproteins on the cell surface of the trichomonad play a major role in the mechanisms of its pathogenesis, adhesion, host–parasite interaction and nutrient acquisition.

Extracellular adenosine triphosphate (ATP) may act as a signalling compound in cytolytic mechanisms [12,13] and it is hydrolysed to adenosine by ectonucleotidases. Several studies have reported the presence of ectonucleotidases on the surface of parasites. Recently, we characterised NTPDase1 [14] and 5'-nucleotidase activities in *T. vaginalis* (Tasca et al., submitted). The NTPDase1 (apyrase,

* Corresponding author. Fax: +55 (51) 3316-5535.

E-mail address: jsarkis@plug-in.com.br (J.J.F. Sarkis).

ecto-ATP diphosphohydrolase, CD39, EC 3.6.1.5) hydrolyses nucleoside di- and triphosphates, producing nucleoside monophosphates and inorganic phosphate. In addition, the ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5), hydrolyzes nucleoside monophosphates, forming the nucleoside adenosine [15,16]. The presence of enzymes performing ATP, adenosine diphosphate (ADP) [14] and adenosine monophosphate (AMP) hydrolysis in trichomonads may be important for: (a) modulation of nucleotide concentration in the extracellular space, (b) protection from the cytolytic effects of extracellular ATP, (c) involvement in signal transduction, and (d) involvement in cellular adhesion. In addition, *T. vaginalis* lacks the ability to synthesise purines and pyrimidines de novo and their growth and survival are dependent upon salvage pathways to generate nucleotides [17,18].

Metronidazole was the first nitroimidazole to show useful clinical activity against many microaerophilic microorganisms and, since 1960, it is still the drug of choice for trichomoniasis [19]. Other nitroimidazoles, although unavailable in North America, are also approved for clinical use in other parts of the world. These include tinidazole, ornidazole, secnidazole, flunidazole, nimorazole and carnidazole [20]. The 5-nitroimidazoles are administered as inactive prodrugs and are converted to cytotoxic forms by susceptible organisms; the drugs are ineffective in aerobic microorganisms or mammalian cells, and this is the basis of its selective toxicity [21]. These compounds require reduction of the nitro group in order to kill susceptible cells, resulting in production of toxic intermediates. The knowledge of mechanisms by which short-lived nitroimidazole radicals kill susceptible organisms is rather incomplete [22]. Some experimental evidence, however, indicates that one of the drug's targets is DNA, where a short-lived reduction product, most probably the protonated one-electron nitro radical anion, oxidises DNA causing strand breaks and subsequent cell death [19]. Damage to other vital systems of the cell may, however, be anticipated, but the direct evidence is missing [22]. In this study, we investigated the effect of metronidazole and tinidazole on the NTPDase1 and the ecto-5'-nucleotidase activities in intact cells from the ATCC strain and from a fresh clinical isolate of *T. vaginalis*.

2. Materials and methods

2.1. Parasites and culture conditions

The 30236 strain from the American Type Culture Collection (ATCC) and the POA-3 strain, a fresh clinical isolate of *T. vaginalis*, were used in this study. The strains were cultivated axenically in trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium [23] without agar (pH 6.0) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated bovine serum, penicillin (1000 IU ml⁻¹) and streptomycin sulphate (1 mg

ml⁻¹) in aerobiosis at 37°C (±0.5°C). Isolates were subcultured every 48 h in TYM medium. Trichomonads in the logarithmic phase of growth and within 48 h of subculture (exhibiting more than 95% mobility and normal morphology) were harvested and washed with sterile saline solution (0.85% NaCl) (750×g for 5 min) three times. Parasites were resuspended in saline solution and counted with a haemocytometer and adjusted to a concentration of 1.5×10⁶ cells ml⁻¹, corresponding to a concentration of 0.3–0.7 mg ml⁻¹ of protein.

2.2. Cell viability

All experiments were performed using intact cells and cellular viability was assessed before and after incubations, by mobility and trypan blue dye exclusion [24]. A 20 µl aliquot of cells was collected from the enzymatic assays and mixed with 20 µl 0.4% trypan blue dye. The cells were counted in a haemocytometer. Trypan blue-stained cells were considered as inviable regardless of the degree of blue [25]. The viability was not affected by incubation conditions.

2.3. In vitro susceptibility assay

Previous experiments were performed in order to evaluate the in vitro susceptibility of trichomonads to the nitroimidazoles as described by Tachezy et al. [26]. Trichomonads from the log phase of growth were exposed to 2-fold serial dilutions of metronidazole and tinidazole in the presence of air or under anaerobiosis for 48 h at 37°C. Standard microtitre plates with eight rows of 12 round-bottom wells were used in the test. The TYM medium was added in 50 µl aliquots to each well. Stock solutions of metronidazole and tinidazole were added in 50 µl aliquots to the wells of the first row. Starting from the wells of the first column 2-fold serial dilutions were made. Finally, 5×10⁴ cells ml⁻¹ from 30236 and POA-3 strains were placed into each well. The plates were incubated aerobically in a humid chamber or in an anaerobic jar (Probac) containing hydrogen-generating envelopes (Anaerobac). Controls with trichomonads, but without addition of drugs were included. The susceptibility test was performed in triplicate for each drug, and with two different cell suspensions, for both strains. After 48 h, the contents of the wells were homogenised and an aliquot was examined under a light microscope at 400× for motile trichomonads.

2.4. NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase activities

Intact cells of *T. vaginalis*, the ATCC 30236 and the fresh clinical isolate, POA-3, were added to the reaction mixture containing 50 mM Tris buffer (pH 7.2), 5 mM CaCl₂, for measuring NTPDase1 activity. For ecto-5'-nucleotidase activity, the cells of both strains were added to

the reaction mixture containing 50 mM Tris buffer (pH 7.5) and 3 mM $MgCl_2$. Metronidazole or tinidazole (10, 25 and 50 μM) was added in both reaction media. The samples were preincubated for 5 min at 37°C in 200 μl of the reaction mixture. The reaction for NTPDase1 activity was initiated by the addition of ATP or ADP to a final concentration of 1 mM, while the reaction for ecto-5'-nucleotidase was initiated by the addition of AMP to a final concentration of 3 mM. The reaction of hydrolysis of ATP and ADP was stopped after 40 min and the reaction of hydrolysis of AMP was stopped after 60 min by adding 200 μl 10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice for 10 min before assaying for the release of inorganic phosphate (Pi) [27]. Incubation times and cellular density were chosen in order to ensure the linearity of the reactions. Controls with the addition of the intact cells after mixing trichloroacetic acid were used to correct non-enzymatic hydrolysis of substrates. Specific activity is expressed as nmol Pi released per min per 1.5×10^6 cells. All samples were run in triplicate, with similar results achieved in at least three different cell suspensions.

2.5. Treatment of cells

In order to investigate the effect of the drugs after a treatment, the cells were kept in presence of metronidazole or tinidazole (50 μM) for 2 h, before washing with sterile saline solution (0.85% NaCl) (750 $\times g$ for 5 min) three times. The subsequent steps for incubation to measure the nucleotide hydrolysis were the same as described above.

2.6. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method [28], using bovine serum albumin as standard.

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA (analysis of variance) and Student's *t*-test, considering a level of significance of 5%.

2.8. Chemicals

Nucleotides, Tris buffer, trypan blue dye and metronidazole were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and tinidazole was a gift from Medley, Brazil. Fresh stock solutions for assays of both drugs were prepared before each experiment. Tinidazole (5 mM) was dissolved in water and metronidazole (5 mM) was dissolved in water by autoclaving (1 atm, 121°C, 15 min) [26] and after these solutions of both drugs were diluted in water to obtain the final concentrations (10, 25, and 50 μM). All other reagents were of the highest analytical grade available.

3. Results and discussion

In the present study we investigated the effects of metronidazole and tinidazole on the NTPDase1 and the ecto-5'-nucleotidase in intact cells of *T. vaginalis*. Cellular integrity and viability were assessed before and after the reactions, by the mobility of trophozoites and trypan blue dye exclusion. The integrity of the cells was not affected by any of the conditions used in the assays.

The in vitro susceptibility to metronidazole and tinidazole was tested for 30236 and POA-3 strains. The strains were susceptible to the drugs in all tested concentrations (data not shown).

The enzymatic activities were measured in one ATCC strain and one fresh clinical isolate of *T. vaginalis*. AMP hydrolysis demonstrated no difference between the investigated strains. Interestingly, ATP and ADP hydrolysis were higher (7- and 5-fold, respectively) in the fresh clinical isolate when compared with the hydrolysis of the ATCC strain, 30236. The NTPDase1 is probably involved in cell pathogenesis, considering the lower time of cultivation of the fresh isolate that maintains the main biological

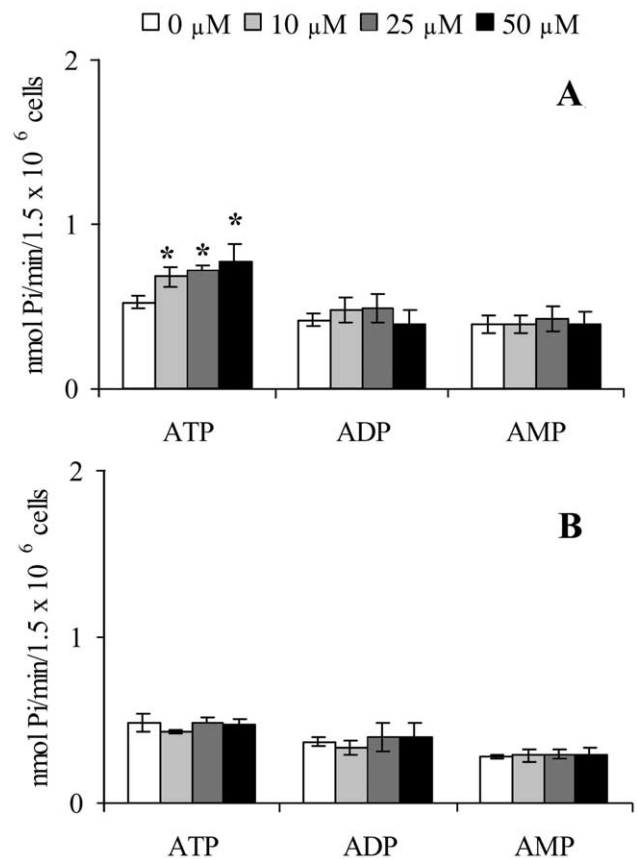


Fig. 1. Effect of metronidazole (A) and tinidazole (B) on ATP, ADP and AMP hydrolysis in the 30236 strain. Bars represent the mean \pm S.D. of at least three experiments using different cell suspensions, each in triplicate. Results were analysed statistically by one-way ANOVA. *Significant difference from controls by one-way ANOVA ($P < 0.05$).

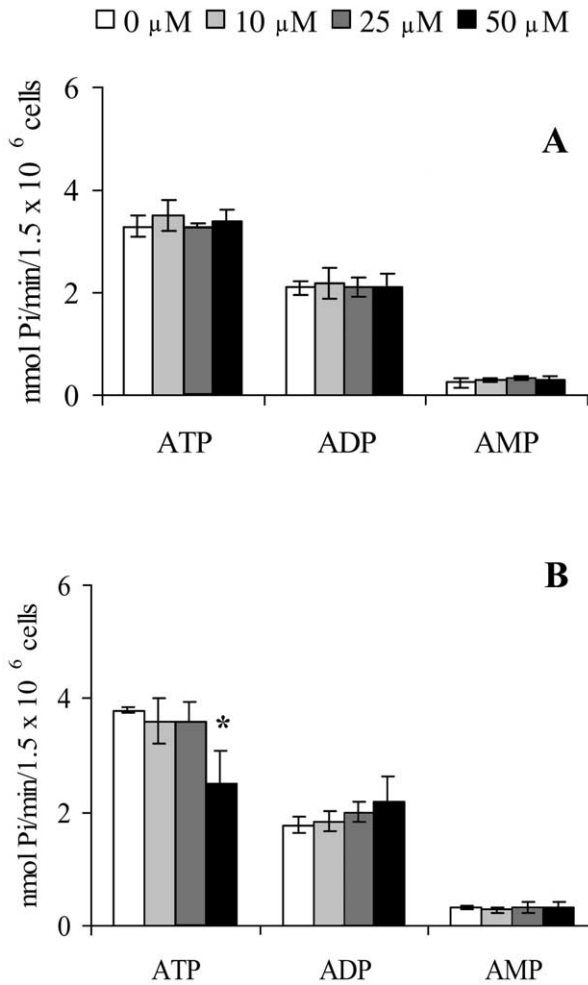


Fig. 2. Effect of metronidazole (A) and tinidazole (B) on ATP, ADP and AMP hydrolysis in the POA-3 strain. Bars represent the mean \pm S.D. of at least three experiments using different cell suspensions, each in triplicate. Results were analysed statistically by one-way ANOVA. *Significant difference from controls by one-way ANOVA ($P < 0.05$).

features of the parasite as in the host site conditions. On the other hand, ATCC cells may present changes in their biochemical metabolism including pathogenesis and immune evasion, due to their maintenance in axenic culture for several years.

Here, *in vitro* studies were conducted to provide more information regarding the direct interaction of nitroimidazole compounds and the ecto-enzymes involved in nucleotide hydrolysis in *T. vaginalis*. Fig. 1 shows the NTPDase1 (ATP and ADP as substrates) and the ecto-5'-nucleotidase (AMP as substrate) activities measured in the presence of metronidazole (Fig. 1A) and tinidazole (Fig. 1B), for the 30236 strain. ATP hydrolysis was activated by 31, 38, and 47% in the presence of all tested concentrations of 10, 25, 50 μ M metronidazole, respectively (Fig. 1A). On the other hand, ADP and AMP hydrolysis did not present significant changes in the presence of metronidazole (Fig. 1A). Tinidazole did not

significantly change the ATP, ADP and AMP hydrolysis at the concentrations tested when compared to the control enzyme activity (no drug added), with the 30236 strain (Fig. 1B). Likewise, the enzymatic activities were tested in the presence of the nitroimidazoles for the POA-3 strain, as shown in Fig. 2. Metronidazole did not significantly change the ATP, ADP and AMP hydrolysis (Fig. 2A) and tinidazole did not change the ADP and AMP hydrolysis (Fig. 2B), with the POA-3 strain. In contrast, ATP hydrolysis of the POA-3 strain was affected by tinidazole 50 μ M, revealing an inhibition of 33% (Fig. 2B). These effects of nitroimidazole derivatives in the ATP hydrolysis could be the result of pharmacological interaction between the enzyme and drugs tested. Here, in order to explain the activation of ATP hydrolysis by metronidazole and the inhibition of ATP hydrolysis by tinidazole, two possibilities could be suggested: (a) these effects involved the participation of an ecto-ATPase, coexpressed with the NTPDase1 in *T. vaginalis*, as observed in rat brain [29], or (b) these effects occurred only in the ATPase activity of the NTPDase1.

The treatment of the 30236 strain in the presence of metronidazole for 2 h presented statistically significant in-

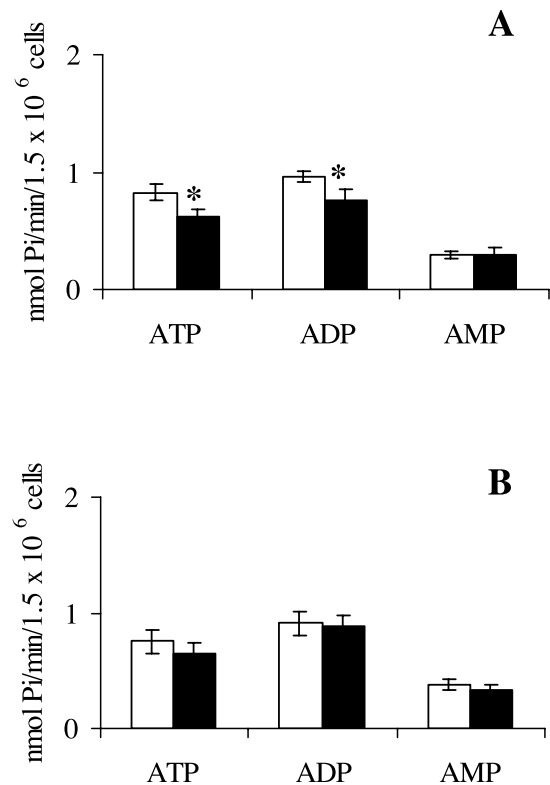


Fig. 3. Effect of metronidazole (A) and tinidazole (B) on ATP, ADP and AMP hydrolysis in the 30236 strain after 2 h of cell treatment. White bars represent controls (without drugs) and black bars represent 50 μ M metronidazole or 50 μ M tinidazole. Bars represent the mean \pm S.D. of at least three experiments using different cell suspensions, each in triplicate. Results were analysed statistically by Student's *t*-test. *Significant difference from controls by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

inhibitions of 25 and 21% for ATP and ADP hydrolysis, respectively (Fig. 3A). In a similar condition, tinidazole did not significantly change the NTPDase1 and the ecto-5'-nucleotidase activities at the concentrations studied when compared to the control enzyme activity (no drug added), in the 30236 strain (Fig. 3B).

Fig. 4 shows the treatment of the POA-3 strain in the presence of metronidazole and tinidazole for 2 h. Metronidazole significantly changed the ATP and ADP hydrolysis, demonstrating inhibitions of 22 and 25%, respectively (Fig. 4A). The treatment with tinidazole presented statistically significant inhibitions of 19% for ATP and 17% for ADP (Fig. 4B).

Metronidazole and tinidazole did not significantly change the ecto-5'-nucleotidase activity at the concentrations studied when compared to the control enzyme activity (no drug added). This finding was similar for both strains, 30236 and POA-3.

When the cells were treated with metronidazole for 2 h, inhibition of ATP and ADP hydrolysis in both strains was observed, whilst tinidazole inhibition was seen only in the POA-3 strain. Previous studies have shown changes in activities of hydrogenosomal and cytosolic enzymes of

T. vaginalis related to development of resistance to metronidazole [22]. Hydrogenosomal enzymes, pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, hydrogenase, malic enzyme (hydrogenosomal L-malate:nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) (NAD(P)) oxidoreductase), and NAD:ferredoxin oxidoreductase are downregulated in metronidazole-resistant cells [30,31]. Conversely, cytosolic enzymes such as lactate dehydrogenase and pyruvate kinase are upregulated in trichomonads resistant to metronidazole [32,33]. In this study, we investigated the behaviour of enzymes involved in the breakdown of extracellular nucleotides in *T. vaginalis* strains sensitive to nitroimidazoles, after a pharmacological interaction with metronidazole and tinidazole. The inhibition in NTPDase1 activity after the treatment was probably due to an attempt by the parasite to modulate the nucleotide concentration in the extracellular space. This phenomenon could be involved in signal transduction, since the enzyme activities measured are involved in the cleavage of ATP to adenosine. As well as its energetic function, extracellular ATP has several effects on many biological processes, these include smooth muscle contraction, neurotransmission, immune response, inflammation, platelet aggregation, and pain [34–37]. Adenosine induces vasodilation, a decrease in glomerular filtration rate, inhibition of neurotransmitter release, inhibition of the immune and inflammatory response or lipolysis. In more primitive organisms, the bacterial 5'-nucleotidase has an ecological function in nutrient recycling in aqueous habitats [38].

Interestingly, tinidazole did not cause any alteration in the NTPDase1 activity in 30236 cells, only in the POA-3 strain. The difference between both strains reinforces the important use of fresh clinical isolates in experimental investigations, in addition to standard strains.

To our knowledge, this is the first report of the effects of 5-nitroimidazoles on the NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase activities in parasites. Our results suggest that the modulation of extracellular ATP and ADP levels during treatment with these drugs could be a parasite defence strategy as a survival mechanism in an adverse environment. More detailed studies will be necessary to clarify the importance and the significance of the results here presented.

Acknowledgements

Grateful thanks to Dr. Sérgio De Meda Lamb, Chairman of the School of Pharmacy (PUCRS) for his support and to Rafael V. Michel for technical assistance. This work was partially supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the Third World Academy of Science (TWAS). T.T. is recipient of a CNPq fellowship.

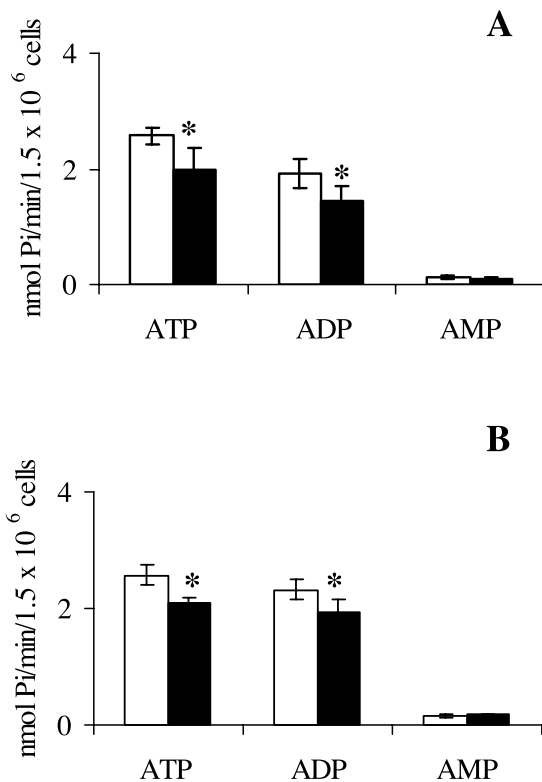


Fig. 4. Effect of metronidazole (A) and tinidazole (B) on ATP, ADP and AMP hydrolysis in the POA-3 strain after 2 h of cell treatment. White bars represent controls (without drugs) and black bars represent 50 μ M metronidazole or 50 μ M tinidazole. Bars represent the mean \pm S.D. of at least three experiments using different cell suspensions, each in triplicate. Results were analysed statistically by Student's *t*-test. *Significant difference from controls by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

References

- [1] Leherker, M.W. and Alderete, J.F. (2000) Biology of trichomonosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 13, 37–45.
- [2] Gerbase, A.C., Rowley, J.T., Heyman, D.H.L., Berkley, S.F.B. and Piot, P. (1998) Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs. *Sex. Transm. Inf.* 74, S12–S16.
- [3] Sorvillo, F. and Kerndt, P. (1998) *Trichomonas vaginalis* and amplification of HIV-1 transmission. *Lancet* 351, 213–214.
- [4] Fleming, D.T. and Wasserheit, J.N. (1999) From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex. Transm. Inf.* 75, 3–17.
- [5] Cotch, M.F., Pastorek, J.G., Nugent, R.P., Hillier, S.L., Gibbs, R.S., Martin, D.H., Eschenbach, D.A., Edelman, R., Carey, J.C., Regan, J.A., Krohn, M., Klebanoff, M.A., Rao, A.V. and Rhoads, G.G. (1997) *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Sex. Transm. Inf.* 24, 353–360.
- [6] Heine, P. and McGregor, J.A. (1993) *Trichomonas vaginalis*: a re-emerging pathogen. *Clin. Obstet. Gynecol.* 36, 137–144.
- [7] Gram, I.T., Macaluso, M., Churchill, J. and Stalsberg, H. (1992) *Trichomonas vaginalis* (TV) and human papillomavirus (HPV) infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade III. *Cancer Causes Control* 3, 231–236.
- [8] Kharsany, A.B., Hoosen, A.A., Moodley, J., Bagaratee, J. and Gouws, E. (1993) The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. *Genitourin. Med.* 69, 357–360.
- [9] Zhang, Z.F. and Begg, C.B. (1994) Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. *Int. J. Epidemiol.* 23, 682–690.
- [10] Grodstein, F., Goldman, M.B. and Cramer, D.W. (1993) Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. *Am. J. Epidemiol.* 137, 577–584.
- [11] Alderete, J.F., Benchimol, M., Leherker, M.W. and Crouch, M.L. (2002) The complex fibronectin–*Trichomonas vaginalis* interactions and Trichomonosis. *Parasitol. Int.* 51, 285–292.
- [12] Filippini, A., Taffs, R.E., Agui, T. and Sitkovsky, M.V. (1990) Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. *J. Biol. Chem.* 265, 334–340.
- [13] Steinberg, T.H. and Di Virgilio, F. (1991) Cell-mediated cytotoxicity: ATP as an effector and the role of target cells. *Curr. Opin. Immunol.* 3, 71–75.
- [14] Matos, J.A.A., Borges, F.P., Tasca, T., Bogo, M.R., De Carli, G.A., Fauth, M.G., Dias, R.D. and Bonan, C.D. (2001) Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Parasitol.* 31, 770–775.
- [15] Sarkis, J.J.F., Battastini, A.M.O., Oliveira, E.M., Frassetto, S.S. and Dias, R.D. (1995) ATP diphosphohydrolases: An overview. *J. Braz. Assoc. Adv. Sci.* 47, 131–136.
- [16] Zimmermann, H. (1996) Extracellular purine metabolism. *Drug Develop. Res.* 39, 337–352.
- [17] Heyworth, P.G., Gutteridge, W.E. and Ginger, C.D. (1982) Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett.* 141, 106–110.
- [18] Heyworth, P.G., Gutteridge, W.E. and Ginger, C.D. (1984) Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett.* 176, 55–60.
- [19] Edwards, D.I. (1993) Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 31, 9–20.
- [20] Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R. and Garber, G. (1998) Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 300–317.
- [21] Mendz, G.L. and Mégraud, F. (2002) Is the molecular basis of metronidazole resistance in microaerophilic organisms understood? *Trends Microbiol.* 10, 370–375.
- [22] Kulda, J. (1999) Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int. J. Parasitol.* 29, 199–212.
- [23] Diamond, L.S. (1957) The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 43, 488–490.
- [24] Shaio, M.F., Chen, J.G. and Chang, F.Y. (1987) A comparison of various methods for the determination of viability of parasitic flagellates. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health* 18, 539–546.
- [25] Tai, K.K. and Truong, D.D. (2002) Activation of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels confers protection against rotenone-induced cell death: Therapeutic implications for Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* 69, 559–566.
- [26] Tachezy, J., Kulda, J. and Tomková, E. (1993) Aerobic resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole induced in vitro. *Parasitology* 106, 31–37.
- [27] Chan, K., Delfert, D. and Junger, K.D. (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375–380.
- [28] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- [29] Kegel, B., Braun, N., Heine, P., Maliszewski, C.R. and Zimmermann, H. (1997) An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology* 36, 1189–1200.
- [30] Drmota, T., Proost, P., Van Ranst, M., Weyda, F., Kulda, J. and Tachezy, J. (1996) Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 221–234.
- [31] Steinbuchel, A. and Muller, M. (1989) Anaerobic pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 57–65.
- [32] Cerkasovova, A., Novak, J., Cerkasov, J., Kulda, J. and Tachezy, J. (1988) Metabolic properties of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole under anaerobic conditions. *Acta Univ. Carolinae Biol.* 30, 505–512.
- [33] Mertens, E., Van Schaftingen, E. and Muller, M. (1992) Pyruvate kinase from *Trichomonas vaginalis* an allosteric enzyme stimulated by ribose 5-phosphate and glycerate-3-phosphate. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54, 13–20.
- [34] Ralevic, V. and Burnstock, G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413–492.
- [35] Sitkovsky, M.V. (1998) Extracellular purines and their receptors in immunoregulation. Review of recent advances. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 65, 351–357.
- [36] Sneddon, P., Westfall, T.D., Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S., Westfall, D.P. and Kennedy, C. (1999) Modulation of purinergic neurotransmission. *Prog. Brain Res.* 120, 11–20.
- [37] Ding, Y., Cesare, P., Drew, L., Nikitaki, D. and Wood, J.N. (2000) ATP, P2X receptors and pain pathways. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 289–294.
- [38] Zimmermann, H. (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285, 345–365.

II.3. CAPÍTULO 3 - Tasca, T., Bonan, C.D., De Carli, G.A., Sarkis, J.J. (2004).

Trichomonas vaginalis: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability. **Parasitology Research** 93: 300-303.

Tiana Tasca · Carla D. Bonan · Geraldo A. De Carli
João J. F. Sarkis

***Trichomonas vaginalis*: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability**

Received: 29 March 2004 / Accepted: 7 April 2004 / Published online: 3 June 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1), which hydrolyzes extracellular ATP and ADP, and ecto-5'-nucleotidase, which hydrolyzes AMP, are characterized for *Trichomonas vaginalis*. Ultrastructural cytochemical microscopy showed NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase activities on the surface of the parasites. High levels of extracellular adenine nucleotides and adenosine did not exert cytolytic effects in intact cells of *T. vaginalis*. Our results suggest that these enzymes are relevant for the survival of the parasite during exposure to extracellular nucleotides. Since the ecto-localization of these enzymes is essential for the maintenance of adenosine extracellular levels, this nucleoside could be important for the purine salvage pathway in the parasite.

Purine nucleosides and nucleotides are mostly released from cells which are stressed or anoxic, injured and metabolically active (reviewed in Chow et al. 1997). There is evidence that purines have cytotoxic properties (Steinberg and Di Virgilio 1991). Signaling actions

induced by extracellular ATP are correlated with the activity of a group of ecto-enzymes, the ectonucleotidases, which hydrolyze ATP to adenosine. This group includes NTPDase1 (CD39, ecto-apyrase, EC 3.6.1.5) and the ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5), which were previously characterized by our laboratory for *Trichomonas vaginalis* (Matos et al. 2001; Tasca et al. 2003a). Trichomonosis is the most common non-viral sexually transmitted disease in the world and it is associated with serious health consequences (Lehker and Alderete 2000).

Recently, ecto-phosphatase activity and its cytochemical localization were characterized in *T. vaginalis* (De Jesus et al. 2002). However, the cytochemical localization of ectonucleotidases has been shown in various parasites, but not in *T. vaginalis*. The distribution of NTPDase1 has been demonstrated in *Schistosoma mansoni* (Vasconcelos et al. 1993, 1996) and in *Leishmania amazonensis* promastigotes (Coimbra et al. 2002). A study on the cytochemical localization of ecto-5'-nucleotidase was made in *Toxoplasma gondii*, which is deficient in the activity of this enzyme (Ngô et al. 2000). To our knowledge, this is the first report of the cytochemical localization of NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase activities in intact cells of *T. vaginalis*. In parallel, we evaluated cellular viability in the presence of increasing concentrations of adenine nucleotides.

The 30236 isolate of *T. vaginalis*, from the American Type Culture Collection, was cultivated in trypticase-yeast extract-maltose medium (Diamond 1957) with 10% heat-inactivated bovine serum, as previously described (Tasca et al. 2003a). For enzyme cytochemistry and viability assays, trichomonads were counted with a hemocytometer and adjusted to a concentration of 1.5×10^6 cells/ml (0.3–0.7 mg/ml of protein). Protein was measured by the Coomassie blue method (Bradford 1976). The NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase activities were measured as previously described (Tasca et al. 2003b). All samples were run in triplicate, with similar results achieved in at least four different cell suspensions. In cytochemistry assays, these enzyme activities were

T. Tasca · J. J. F. Sarkis (✉)
Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90035-003 Porto Alegre, Brazil
E-mail: jjsarkis@plug-in.com.br
Tel.: +55-51-33165554
Fax: +55-51-33165535

T. Tasca · G. A. De Carli
Laboratório de Parasitologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900 Porto Alegre, Brazil

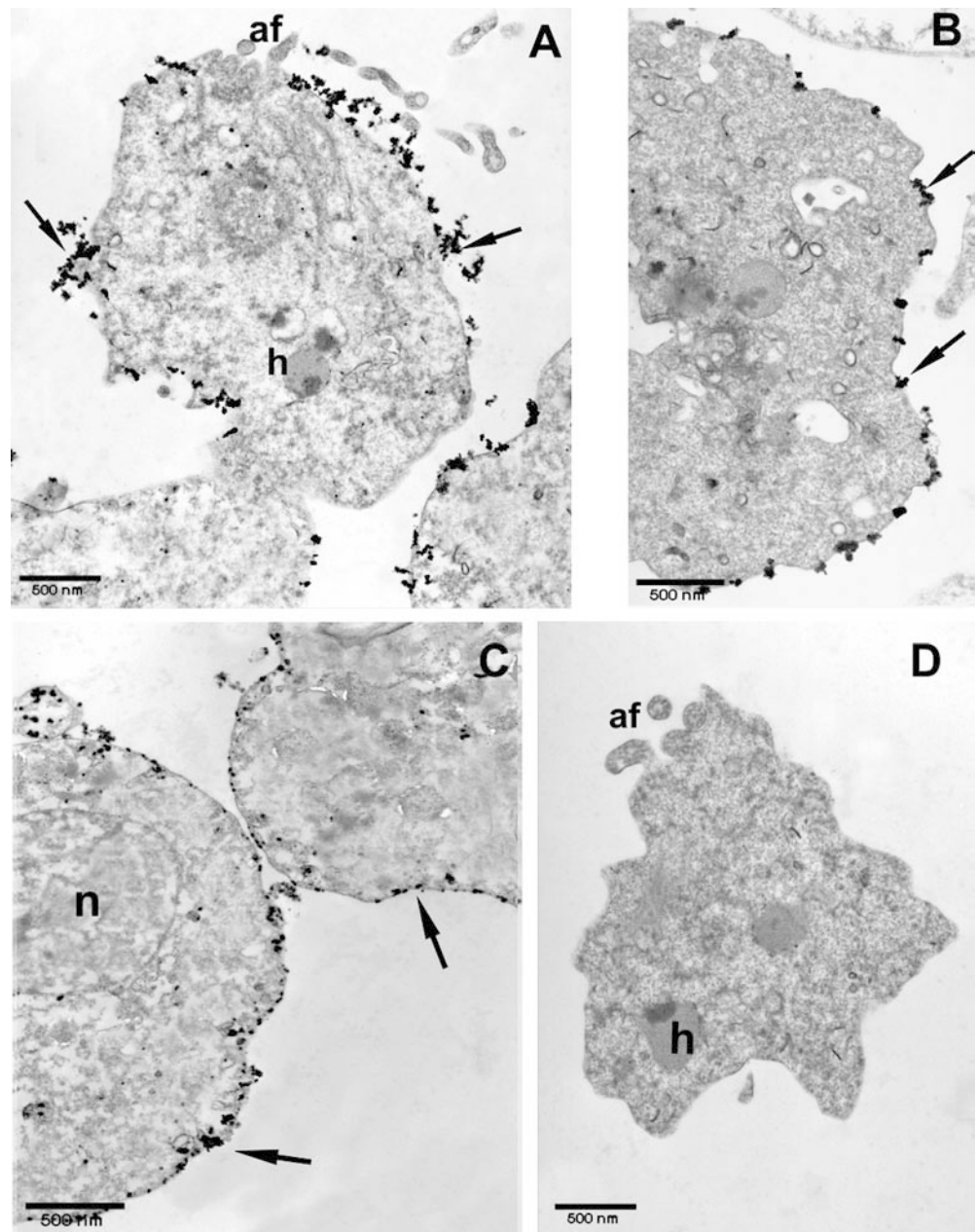
C. D. Bonan
Laboratório de Pesquisa Bioquímica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900 Porto Alegre, Brazil

T. Tasca
Department of Microbiology, University of Texas Health Science Center, MC7758, 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, TX 78229-3900, USA

detected by an electron-dense precipitate of lead phosphate that is formed by the release of Pi after ATP, ADP (for NTPDase1) and AMP hydrolysis (for ecto-5'-nucleotidase) (Caldas and Wasserman 1995). Intact cells were incubated in a reaction medium containing 25 mM TRIS-maleate buffer (pH 7.2), 5.0 mM CaCl₂ (for NTPDase 1), 5.0 mM MgCl₂ (for 5'-nucleotidase) and 2.0 mM Pb(NO₃)₂. To avoid the influence of other enzymes, inhibitors (1.0 mM levamisole, 0.1 mM vanadate, 0.1 mM *N*-ethyl maleimide and 1.0 mM ouabain) were added to both reaction media. The reaction was initiated by the addition of 3.0 mM ATP or ADP and AMP. The incubation for both enzyme activities was performed at 37°C for 1 h and the reaction was stopped by immersion of the samples in ice-water for 5 min

followed by centrifugation. Controls were performed in which the incubations were conducted in the above media without substrates. After centrifugation, the pellets were washed three times with 0.1 mM cacodylate buffer, pH 7.2 and fixed in 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mM cacodylate buffer, pH 7.2, for 1 h. Post-fixation was performed in 1% osmium tetroxide in 0.1 mM cacodylate buffer, pH 7.2, for 30 min. Dehydration was carried out in acetone and samples were included in araldite resin. Ultrathin sections (100 nm) were cut with an ultramicrotome (Leica UTC 2.0), and samples were stained with uranyl acetate and lead citrate. Stained and unstained sections were observed with a Jeol (JEM 1200 EXII) electron microscope. For the cellular viability assays, the cells were

Fig. 1A–D Ultrastructural localization of NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase activities in intact cells of *Trichomonas vaginalis*. Arrows show electron-dense lead phosphate deposits originating from: **A** ATP, **B** ADP, and **C** AMP hydrolysis distributed at the surface of the plasma membrane of the parasites. **D** Control without substrates as described in the text. *af* Anterior flagella, *h* hydrogenosomes, *n* nucleus



incubated at 37°C in the presence of 5.0, 10 or 15 mM ATP, ADP, AMP or adenosine. To evaluate cellular viability, a 10- μ l aliquot of cells was collected from the assays at 2, 4 and 8 h of incubation and mixed with 10 μ l 0.4% trypan blue dye and counted. In parallel, cell viability was evaluated by lactate dehydrogenase activity, as a percentage, in comparison with the lysed cells (100%), after immersion in liquid nitrogen (-196°C) for 60 s.

We previously characterized NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase activities in *T. vaginalis* (Matos et al. 2001; Tasca et al. 2003a). The 30236 isolate showed NTPDase1 activity, 0.50 ± 0.06 nmol Pi/min/ 1.5×10^6 cells for ATP and 0.43 ± 0.08 nmol Pi/min/ 1.5×10^6 cells for ADP (mean \pm SD, $n=12$). The ecto-5'-nucleotidase activity shown by this isolate was 0.32 ± 0.05 nmol Pi/min/ 1.5×10^6 cells ($n=9$).

The cytochemical localization of NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase activities was detected by the formation of electron-dense precipitates of lead phosphate, deposited in the vicinity of the enzymes, as observed at the plasma membrane surface, along the trophozoites (Fig. 1). Figure 1A and B shows the ecto-localization of NTPDase1, which appeared to be distributed at the external surface of the parasite even when different substrates, ATP (Fig. 1A) or ADP (Fig. 1B), were used. The external localization of ecto-5'-nucleotidase is shown in Fig. 1C, with the lead phosphate deposits formed at the plasma membrane surface, demonstrating AMP hydrolysis. In the absence of nucleotides, no electron-dense deposits were seen (Fig. 1D). The evaluation of cellular viability using trypan blue exclusion and lactate dehydrogenase activity showed that none of the tested concentrations of adenine nucleotides and adenosine produced cytotoxicity to *T. vaginalis* (data not shown).

Several studies have shown that extracellular ATP may act as a signaling compound in cytolytic mechanisms (Steinberg and Di Virgilio 1991). The concentration of free purine nucleotides encountered in the human vagina, the natural site of *T. vaginalis*, originating from the discharged and lysed epithelial cells during the infection, can reach 10 mM, of which 90% are adenine nucleotides (Munagala and Wang 2003). Considering the high levels of extracellular nucleotides, the presence of enzymes performing ATP, ADP and AMP hydrolysis is essential for parasite survival in a hostile changing environment by modulating the nucleotide concentration in the extracellular space and by protecting from the cytolytic effects of extracellular ATP. Our data show that high levels of extracellular adenine nucleotides and adenosine did not exert cytolytic effects on intact cells of *T. vaginalis*, being hydrolyzed by NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase. Experiments using antibodies against the enzymes and the search for the corresponding genes in *T. vaginalis* are in progress.

Modulation of nucleotide concentration in the extracellular space, protection from the cytolytic effects of extracellular ATP, and participation in the salvage

pathway of nucleosides are some aspects of the physiology of *T. vaginalis* involving the breakdown of ATP. *T. vaginalis* lacks the ability to synthesize purines and pyrimidines de novo, and its growth and survival is dependent on salvage pathways to generate nucleotides (Heyworth et al. 1982). Taking into account the high levels of purine nucleotides and nucleosides in the host site occupied by *T. vaginalis*, the lack of cytolytic effects on the parasites and the ecto-localization of the enzymes involved in the hydrolysis of the nucleotides, we suggest that the NTPDase1 and the ecto-5'-nucleotidase modulate the levels of extracellular ATP, ADP and AMP. The final product of these reactions, the nucleoside adenosine, is taken up by the parasite (Harris et al. 1988). Recently, Munagala and Wang (2003) showed that adenosine is the primary precursor of the entire purine nucleotide pool in *T. vaginalis*, and they identified adenosine deaminase, IMP dehydrogenase and GMP synthetase activities in the parasite lysate, suggesting a pathway capable of converting adenine to GMP via adenosine. Considering the importance of adenosine in the purine salvage in *T. vaginalis*, NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase are essential for the survival strategies of the parasite during exposure to the extracellular nucleotides.

Acknowledgements We wish to thank the Centro de Microscopia Eletrônica (CME), UFRGS, Faculdade de Farmácia (PUCRS), CNPq and FAPERGS. T.T. is recipient of a CNPq fellowship.

References

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:218–254
- Caldas ML, Wasserman M (1995) Estandarización de un método citotímico con microscopia electrónica para detectar actividad enzimática en células completas. *Biomedica* 15:197–205
- Chow SC, Kass Gen, Orrenius S (1997) Purines and their roles in apoptosis. *Neuropharmacology* 36:1149–1156
- Coimbra ES, Goncalves-da-Costa SC, Corte-Real S, De Freitas FGR, Duraõ AC, Souza CSF, Silva-Santos MI, Vasconcelos EG (2002) Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitology* 124:137–143
- De Jesus JB, Podlyska TM, Hampshire A, Lopes CS, Vannier-Santos MA, Meyer-Fernandes JR (2002) Characterization of an ecto-phosphatase activity in the human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* 88:991–997
- Diamond LS (1957) The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol* 43:488–490
- Harris DI, Beechey RB, Linstead D, Barrett J (1988) Nucleoside uptake by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 29:105–116
- Heyworth PG, Gutteridge WE, Ginger CD (1982) Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett* 141:106–110
- Lehker MW, Alderete JF (2000) Biology of trichomonosis. *Curr Opin Infect Dis* 13:37–45
- Matos JAA, Borges FP, Tasca T, Bogo MR, De Carli GA, Fauth MG, Dias RD, Bonan CD (2001) Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol* 31:770–775
- Munagala NR, Wang CC (2003) Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 127:143–149

- Ngô HM, Ngo EO, Bzik DJ, Joiner KA (2000) *Toxoplasma gondii*: are host cell adenosine nucleotides a direct source for purine salvage? *Exp Parasitol* 95:148–153
- Steinberg TH, Di Virgilio F (1991) Cell-mediated cytotoxicity: ATP as an effector and the role of target cells. *Curr Opin Immunol* 3:71–75
- Tasca T, Bonan CD, De Carli GA, Battastini AM, Sarkis JJ (2003a) Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity from intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Exp Parasitol* 105:167–173
- Tasca T, Borges FP, Bonan CD, De Carli GA, Battastini AM, Sarkis JJ (2003b) Effects of metronidazole and tinidazole on NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase from intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiol Lett* 226:379–84
- Vasconcelos EG, Nascimento PS, Meirelles MNL, Verjovski-Almeida S, Ferreira ST (1993) Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase on the external surface of tegument of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 58:205–214
- Vasconcelos EG, Ferreira ST, Carvalho TMU, De Souza W, Kettlun AM, Mancilla M, Valenzuela MA, Verjovski-Almeida S (1996) Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 271:22139–22145

II.4. CAPÍTULO 4 - Tasca, T., Bonan, C.D., De Carli, G.A., Sarkis, J.J., Alderete, J.F. Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology** (no prelo).

Esta parte da tese foi desenvolvida na forma de Doutorado-Sanduiche, no Laboratório do Prof. Dr. John F. Alderete, Department of Microbiology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas, USA.

II.5. CAPÍTULO 5

**A) Análise molecular da nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase -
NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase de *Trichomonas vaginalis***

B) Purificação da NTPDase de *Trichomonas vaginalis*

(Dados preliminares)

**Esta parte da tese foi desenvolvida na forma de Doutorado-Sanduíche, no
Laboratório do Prof. Dr. John F. Alderete, Department of Microbiology,
University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas, USA.**

A) Análise molecular da nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase - NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase de *Trichomonas vaginalis*

Introdução

Nucleotídeos extracelulares podem agir como compostos sinalizadores e podem ser inativados por hidrólise via enzimas que constituem a família E-NTPDase (ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase) (Zimmermann, 2001). Atividades de nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase - NTPDase1 (CD39, ecto-apirase, ecto-ATP difosfoidrolase, EC 3.6.1.5) e de ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5) foram caracterizadas em *T. vaginalis* (Matos et al., 2001; Tasca et al., 2003, Capítulo 1).

O papel fisiológico das ectonucleotidases na superfície dos parasitos ainda é desconhecido. Entretanto, várias hipóteses têm sido sugeridas: (a) proteção dos efeitos citolíticos do ATP extracelular; (b) modulação da concentração de nucleotídeos no espaço extracelular; (c) participação das vias de salvação através da hidrólise seqüencial de ATP até adenosina; (d) envolvimento na transdução de sinal, (e) envolvimento na adesão celular. Até hoje, algumas funções célula- e tecido-específicas foram elucidadas para a NTPDase1, que é expressa em linfócitos ativados. A adesão envolve atividade de tirosina quinase, mas não é alterada pelo quelante de íons metálicos divalentes, EDTA, sugerindo que a atividade catalítica da NTPDase1 não está envolvida (Zimmermann, 2001). Além disso, a ecto-5'-nucleotidase (CD73) isolada de moela de galinha liga-se à fibronectina e laminina, e essa ligação foi bloqueada por anticorpos anti-CD73. Laminina e fibronectina também alteraram a atividade da ecto-5'-nucleotidase do músculo liso de moela de galinha (Resta et al., 1998).

Em uma recente revisão, Alderete et al. (2002) relataram que uma maior compreensão da natureza não auto-limitada da tricomonose pode ser baseada em recentes achados ilustrando a complexidade das interações *T. vaginalis*-fibronectina. O parasito rapidamente se adere a superfícies recobertas com fibronectina e liga-se à fibronectina de um modo altamente específico, mediado por receptor. A quantidade e afinidade da ligação à fibronectina por organismos vivos são influenciadas por concentrações de ferro e cálcio. Além disso, sabe-se que a isoforma 1 da glicoproteína da matriz extracelular laminina é um importante ligante para alguns protozoários parasitos, incluindo *T. vaginalis* (Silva-Filho et al., 2002). Portanto, a patogenicidade do *T. vaginalis* inicia com a colonização específica do epitélio vaginal, onde a citoaderência exerce um papel fundamental.

A natureza complexa da patogenicidade da tricomonose é evidenciada pela estratégia altamente desenvolvida e sofisticada para o parasitismo realizado por este protozoário transmitido sexualmente (Alderete et al., 1998). A compreensão do papel fisiológico da NTPDase1 e da ecto-5'-nucleotidase em *T. vaginalis* pode contribuir para um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos nas interações específicas parasito-hospedeiro. O objetivo deste estudo foi investigar a possível função da NTPDase1 (CD39) e da ecto-5'-nucleotidase (CD73) como moléculas de adesão em *T. vaginalis*.

Materiais e Métodos

Parasitas e condições de cultivo. Os isolados clínicos frescos de *T. vaginalis* T016 e T068-II foram cultivados durante, no máximo, uma semana a 37 °C através de passagens diárias no

meio de tripticase-extrato de levedo-maltose (TYM) suplementado com soro de cavalo inativado pelo calor a 5% (Diamond, 1957).

Isolamento de DNA. O DNA foi extraído pelo método DNAZOL™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de culturas de *T. vaginalis* com densidades de 3×10^6 trofozoítos/ml. Previamente à quantificação, RNase A e proteinase K foram adicionadas para remover RNA e proteína contaminantes, respectivamente. Em seguida, foi empregado o processo de extração do DNA usando a mistura fenol-clorofórmio. Após duas extrações com clorofórmio, o DNA foi precipitado usando-se etanol, seguido de dissolução em tampão TE (EDTA 1,0 mM e Tris-HCl 10 mM, pH 8,0) e estocado a 4°C (Alderete et al., 1995; 2004).

PCR. Com o objetivo de verificar a presença do gene da NTPDase1 e da ecto-5'-nucleotidase no genoma de *T. vaginalis*, PCR foi desenvolvida usando-se 100 ng do DNA genômico isolado dos parasitos. Os iniciadores utilizados neste estudo estão listados na Tabela 5.A.1. Os iniciadores foram sintetizados no Center for Advanced DNA Technologies, University of Texas Health Science Center at San Antonio, com exceção daqueles usados na amplificação da NTPDase1 e da ecto-5'-nucleotidase humanas, os quais foram uma generosa doação do Prof. Dr. Simon C. Robson (Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA).

Tabela 5.A.1. Iniciadores usados neste estudo.

Nomes dos iniciadores	Seqüências
Iniciadores testados para amplificar o gene da NTPDase1	
Iniciadores baseados nas ACRs de seqüências humana e de camundongo	
5'1CD39 + 3'1CD39	5' CAACAATAGCTACCGAGGTGTAGG 3' + 5' GCCGTAGCAGAGGAAGGAGTGGGAGTAAAC 3'
5'2CD39 + 3'2CD39	5' ATGCCGACCCAAAGGCAAACCATGTAG 3' + 5' GATGATGTAGAGGCCATCGAAGCAGTACTT 3'
5'3CD39 + 3'2CD39	5' CCGAGGGAGCTAGAGCCGCCGGAAGGTGT 3' + 5' GATGATGTAGAGGCCATCGAAGCAGTACTT 3'
5'ACR2 + 44	5' AGCCACGGCAGGCATGCGGTTGC 3' + 5' CTCCCAAGGTCCAAAGC 3'
5'ACR4 + 3'ACR4	5' GAAACCAATAATCAGGAAACC 3' + 5' GATGGCATTGTTGATAGTTTCC 3'
5'ACR5 + 3'ACR5	5' GGGCTACATGCTGAACCTGAC 3' + 5' GGAAAATGCTCCCTGGACG 3'
Baseados nas ACRs de seqüências de <i>Schistosoma mansoni</i>	
5'CD39Sm + 3'CD39Sm	5' GCAACTGCTGGTATGCGATTA AAC 3' + 5' GATTTGTGTACTAGCTCCGCCAAG 3'
Iniciadores usados na amplificação do gene da NTPDase1 humana	
28 + 45	5' ATGGCAAGGACTACAATG 3' + 5' TGCTGGAATGGAAGAGTCA 3'
27 + 45	5' CTACCCCTTTGACTTCCA 3' + 5' TGCTGGAATGGAAGAGTCA 3'
28 + 46	5' ATGGCAAGGACTACAATGT 3' + 5' GAAAAGCAGTATTCACTCA 3'
27 + 44	5' CTACCCCTTTGACTTCCA 3' + 5' CTCCCAAGGTCCAAAGC 3'
24 + 43	5' GAAAAGACGAGGAAAGAGG 3' + 5' CTGCCAACTCTTCACTTTC 3'
25 + 40	5' CACTGCGATGGAGGAAAAT 3' + 5' TCCCACTCCACCTATGTCT 3'
29 + 46	5' TCCCAGTGTGCCTTCAAT 3' + 5' GAAAAGCAGTATTCACTCA 3'
23 + 40	5' AGAATCTAGACAGTAAAAGCCAAGGAAGC 3' + 5' TCCCACTCCACCTATGTCT 3'
29 + 34	5' TCCCAGTGTGCCTTCAAT 3' + 5' TGGAGTGGGAGAGAGGTGTGGACAATGGT 3'
28 + 34	5' ATGGCAAGGACTACAATGT 3' + 5' TGGAGTGGGAGAGAGGTGTGGACAATGGT 3'
Iniciadores testados para amplificar o gene da ecto-5'-nucleotidase	
5'2CD73 + 3'1CD73	5' GAGTGTTAGGAGGTGTGTACCCTACAAGTG 3' + 5' CCAGGAGTGGCCGCCAACAACGATATCAAC 3'
5'2CD73 + 3'2CD73	5' GAGTGTTAGGAGGTGTGTACCCTACAAGTG 3' + 5' GCCGAGGTACTTGCCGAAAGCGTAAGCCTC 3'
5'2CD73 + 3'3CD73	5' GAGTGTTAGGAGGTGTGTACCCTACAAGTG 3' + 5' TTCGCCTGTGGACTGCCGGTAACG 3'
5'3CD73 + 3'3CD73	5' TACAAGACCTTGGTGCATAGG 3' + 5' ATGCATTCCGCCACCTGCAGGAA 3'
5'4CD73 + 3'4CD73	5' CGTAATGTTGGACTTCATCTATTC 3' + 5' CAGATAGACAATTGTTTTCCCTAA 3'
Iniciadores usados na amplificação do gene da ecto-5'-nucleotidase humana	
430 + 848	5' GATCGAGCCACTCCTCAA 3' + 5' GCCCATCATCAGAAGTGAC 3'

Resultados e Discussão

Com o objetivo de melhor caracterizar a NTPDase1 e a ecto-5'-nucleotidase em *T. vaginalis*, foram testadas técnicas moleculares visando a amplificação e clonagem dos genes para obtenção de proteínas recombinantes a serem testadas como moléculas de adesão no parasito. Diversos iniciadores foram desenhados com base nas seqüências das enzimas conhecidas de outros organismos (Tabela 1) (Resta et al., 1993; Maliszewski et al., 1994; Asai et al., 1995; Vasconcelos et al., 1996). Nenhum produto de PCR foi amplificado do gene da NTPDase1 e da ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis*. Os resultados indicam que as seqüências das enzimas em *T. vaginalis* divergem consideravelmente das seqüências encontradas em outros organismos. Exatamente na semana do meu retorno ao Brasil, foi publicado o início da anotação do genoma do *T. vaginalis* e entre as seqüências anotadas estão as dos genes da NTPDase3 e 4 (TIGR, 2004 – Anexo 5.A.1). Estudos futuros contribuirão para o conhecimento ao nível molecular das enzimas e para a compreensão da função fisiológica dessas enzimas no *T. vaginalis*.

Referências Bibliográficas

- Alderete, J.F., Provenzano, D., Lehker, M.W. (1995). Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microbial Pathogenesis* 19, 93-103.
- Alderete, J.F., Engbring, J., Lauriano, C.M., O'Brien, J.L. (1998). Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron. *Microbial Pathogenesis* 24, 1-16.
- Alderete, J.F., Benchimol, M., Lehker, M.W., Crouch, M.-L. (2002). The complex fibronectin-*Trichomonas vaginalis* interactions and trichomonosis. *Parasitology International* 51, 285-292.
- Alderete, J.F., Nguyen, J., Mundodi, V., Lehker, M.W. (2004). Heme-iron increases levels of AP65-mediated adherence by *Trichomonas vaginalis*. *Microbial Pathogenesis* 36, 263-271.
- Asai, T., Miura, S., Sibley, L.D., Okabayashi, H. & Takeuchi, T. (1995). Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 11391-7.
- Diamond, L. S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *Journal of Parasitology* 43, 488-490.
- Maliszewski, C. R., Delespesse, G. J., Schoenborn, M. A., Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Nakajima, T., Baker, E., Sutherland, G.R., Poindexter, K., Birks, C., Alpert, A., Friend, D., Gimpel, S.D., Gayle III, R.B. (1994). The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *Journal of Immunology* 153, 3574-3583.

- Matos, J.A.A., Borges, F.P., Tasca, T., Bogo, M.R., De Carli, G.A., Fauth, M.G., Dias, R.D., Bonan, C.D. (2001). Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology* 31, 770-775.
- Resta, R., Hooker, S.W., Hansen, K.R., Laurent, A.B., Park, J.L., Blackburn, M.R., Knudsen, T.B., Thompson, L.F. (1993). Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73): cDNA cloning and tissue distribution. *Gene* 133, 171-177.
- Resta, R., Yamashita, Y., Thompson, L.F. (1998). Ecto-enzyme e signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunology Reviews* 161, 95-109.
- Silva-Filho, F.C., Kasai, S., Nomizu, M., Lopez, L.B., Melo-Braga, M.B., Rocha-Azevedo, B., Petropolis, D.B., Horbach, I.S. (2002). How laminin-1 can be recognized by the protozoan parasite *Tritrichomonas foetus*: possible role played by the extracellular matrix glycoprotein in both cytoadhesion e cytotoxicity exerted by the parasite. *Parasitology International* 51, 305-307.
- Tasca, T., Bonan, C.D., De Carli, G.A., Battastini, A.M., Sarkis, J.J. (2003). Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity from intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Parasitology* 105, 167-173.
- TIGR – The Insitute for Genomic Research. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.tigr.org>
- Vasconcelos, E.G., Ferreira, S.T., Carvalho, T.M.U., De Souza, W., Kettlun, A.M., Mancilla, M., Valenzuela, M.A., Verjovski-Almeida, S. (1996). Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Biological Chemistry* 36, 22139-22145.

Zimmermann, H. (2001). Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. *Drug Development Research* 52, 44-56.



trichomonas vaginalis

- TIGR Home
- TIGR Database
- Genome Home
- Introduction
- Related Links
- Help

Search Results

Select Feature(s) To Turn ON/OFF Display

[T. vaginalis home](#)

[What's New](#)

[Annotation Database](#)

[Search:](#)

- [Gene Name Search](#)
- [Locus Search](#)
- [Sequence Search](#)

[Download Sequences](#)

[T. vaginalis Links](#)

Ident Information

- Locus
- Comment
- EC #
- Gene name

Display

Evidence

- BLASTP
- HMM2
- PROSITE
- Interpro

	3.6.1.6	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4 (ec 3.6.1.6)(ntpdase4) (uridine-diphosphatase) (udpase) (lysosomal apyrase-likeprotein of 70 kda)., putative	View annotatic
	3.6.1.5	nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3, putative	View annotatic

For *T. vaginalis* Comments/Questions send mail to tv@tigr.org.



trichomonas vaginalis

Trichomonas vaginalis

40038.m00041

[Download sequence](#) [Show genomic region on 105554](#)

Gene Identification

Gene Product Name: **ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4 (ec 3.6.1.6)(ntp (udpase) (lysosomal apyrase-likeprotein of 70 kda),, putative**

Temporary Identifier: **40038.m00041**

Comment:

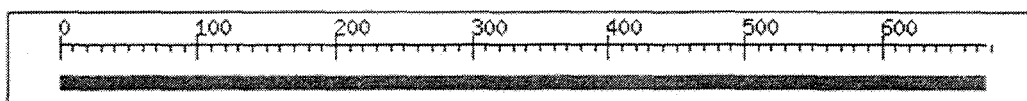
Gene Ontology Classification |

None found

Attributes

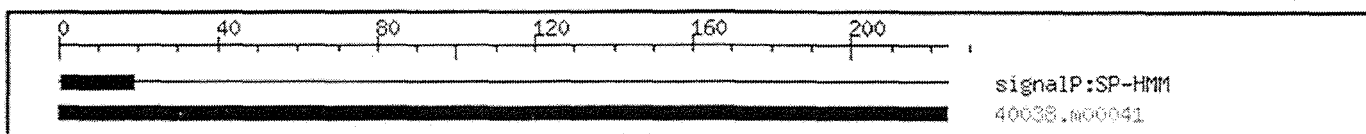
Chromosome: 1
 Coordinates (5' - 3'): 35686 - 36360 on assembly 1055541
 Nucleotide length: 672
 Predicted protein length: 224
 Predicted molecular weight: 25407.85
 Predicted pI: 8.96

Gene structure



Intron/Exon structure in nucleotide coordinates relative to the start of the gene. Click on the picture to display evid gene structure.

Protein features



HMM/PFAM hits

Accession	Name	Total Score	Trusted cutoff	Noise cutoff	Total exp
-----------	------	-------------	----------------	--------------	-----------

BER searches

sequence information

Genomic sequence length: 672 nucleotides

CDS length: 675 nucleotides

Protein length: 224 amino acids

Genomic sequence

>40038.t00020

```
ATGTTACTTTTTCTCTCTTCATTAGCTCTTGCAAAAAACATTATAATCATTGATGCGGGA
AGTACAGGAAGTAGATTGTATATTTATACATACGATGACATCTACAATCTGTCATCCTAC
GATCAAATTCGCGATTTCAGACGGGAAACCAGTTTCTATTAAGTCTTCAATACCATTATCC
GACACATTAATAATGAATCTAAACTCGTCAATACTTCGATGTTTTGCTCGATAAAGGA
TCCCATAATTACATCGAAAAGACGATGAGATCAACAACCTCCGCTTTATTTGTTTGCCTCT
GGTGGGTTAAATTATATTGAGAGCGAAAAGGCTAGAAAAACCGTAATGAATGACGCATTC
CAATACGTAAATCAAAAGTATCGTTATCTTGTGAAAGACAACACTACTCCAAATTGTTACT
GGCAAGGAAGAAGCTGAGTTCGCATGGATTGCAGCTAATCATTTTCTTGGTGGCTTTGAT
TCAAATAATATCATGGGCGTAGCCGAAATTGGAGGCACACACGCACAGATTGCCTTTGGT
GTATCTAAACCATCCTCTGATGCAAAGAAGTATGTTCGAGTCAATCTCAGTAAATAAGAAG
AAATACAAAGTTTTTAGGAACTCATGGAAAACCTATGGAGATGTTGATGTCGAAAAATCAA
TTCTTCAGCATTAA
```

CDS

>40038.m00041

```
ATGTTACTTTTTCTCTCTTCATTAGCTCTTGCAAAAAACATTATAATCATTGATGCGGGA
AGTACAGGAAGTAGATTGTATATTTATACATACGATGACATCTACAATCTGTCATCCTAC
GATCAAATTCGCGATTTCAGACGGGAAACCAGTTTCTATTAAGTCTTCAATACCATTATCC
GACACATTAATAATGAATCTAAACTCGTCAATACTTCGATGTTTTGCTCGATAAAGGA
TCCCATAATTACATCGAAAAGACGATGAGATCAACAACCTCCGCTTTATTTGTTTGCCTCT
GGTGGGTTAAATTATATTGAGAGCGAAAAGGCTAGAAAAACCGTAATGAATGACGCATTC
CAATACGTAAATCAAAAGTATCGTTATCTTGTGAAAGACAACACTACTCCAAATTGTTACT
GGCAAGGAAGAAGCTGAGTTCGCATGGATTGCAGCTAATCATTTTCTTGGTGGCTTTGAT
TCAAATAATATCATGGGCGTAGCCGAAATTGGAGGCACACACGCACAGATTGCCTTTGGT
GTATCTAAACCATCCTCTGATGCAAAGAAGTATGTTCGAGTCAATCTCAGTAAATAAGAAG
AAATACAAAGTTTTTAGGAACTCATGGAAAACCTATGGAGATGTTGATGTCGAAAAATCAA
TTCTTCAGCATTAA
```

Protein

>40038.m00041

```
MLLFLSSLALAKNIIIIIDAGSTGSRLYIYTYDDIYNLSSYDQIRSDGKPVSIKSSIPLS
DTLNNESKLVEYFDVLLDKGSHNYIEKTMRSTTPLYLFFASGGLNYIESEKARKTVMNDAF
QYVNQKYRYLVKDNYFQIVTGKEEAEFAWIAANHFLGGFDSNNIMGVAEIGGTHAQIAFG
VSKPSSDAKKYVESISVNKKKYKVFNRNSWKTMEMLMSKNQFFSI*
```

trichomonas vaginalis

Trichomonas vaginalis

38737.m00006

[Download sequence](#) [Show genomic region on 1055380](#)

Gene Identification

Gene Product Name: nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3, putative

Temporary Identifier: 38737.m00006

Comment:

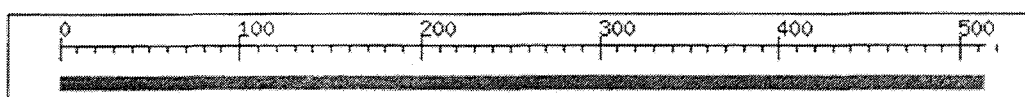
Gene Ontology Classification | 

None found

Attributes

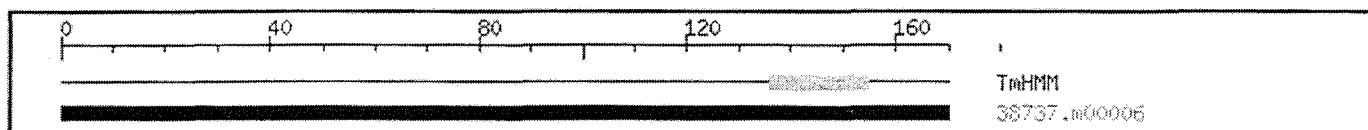
Chromosome:	1
Coordinates (5' - 3'):	3123 - 3635 on assembly 1055380
Nucleotide length:	510
Predicted protein length:	170
Predicted molecular weight:	19906.04
Predicted pI:	8.82

Gene structure



Intron/Exon structure in nucleotide coordinates relative to the start of the gene. Click on the picture to display evid gene structure.

Protein features



HMM/PFAM hits

Accession	Name	Total Score	Trusted cutoff	Noise cutoff	Total exp
-----------	------	-------------	----------------	--------------	-----------

BER searches

[View BER Searches](#) [View Blastp Searches](#)

sequence information**Genomic sequence length:** 510 nucleotides**CDS length:** 513 nucleotides**Protein length:** 170 amino acids**Genomic sequence**

>38737.t00002

```
ATGCTTTTGAAATCAGTTGAATTCAATTCTATATCAGTACCAAATTTAGAGTATATTGAT
AGATTTGTTGCTATGTCTTCAATATACTATAACAAACAAATCTTCAATTTATCACGATCA
TCAACACTTAAAGAGCTTAAACACAAGCTTTAGATTTTTGCCGGAAAGACTGGTCACTG
CTTCCAGATCACATCACAAATATTAGTTATTCTCCAACATACTGCTGGAAAGGTACCTAT
CAATACAATGTTCTTTCAAAGGGTATAAATTTAAAGATTCCAACGTTGTAATCGATAAA
GAAATAAAATCAATGGCGTTGATTTGAGTTGGACTGTTGGTTCGATGCTTAGCGAGATT
ACTGAAATAGAAATTGATGATCAAGAAAAATTGACATTTAAAGACTTCTTTATTGCAGCA
TTGTCTGTTGCAATTTGTTGTATTTTATTATATATTGCCGGGTTAAGCGCTTCAATTGG
CTTTATATACGAAAAACCCGCAAATGTTATAA
```

CDS

>38737.m00006

```
ATGCTTTTGAAATCAGTTGAATTCAATTCTATATCAGTACCAAATTTAGAGTATATTGAT
AGATTTGTTGCTATGTCTTCAATATACTATAACAAACAAATCTTCAATTTATCACGATCA
TCAACACTTAAAGAGCTTAAACACAAGCTTTAGATTTTTGCCGGAAAGACTGGTCACTG
CTTCCAGATCACATCACAAATATTAGTTATTCTCCAACATACTGCTGGAAAGGTACCTAT
CAATACAATGTTCTTTCAAAGGGTATAAATTTAAAGATTCCAACGTTGTAATCGATAAA
GAAATAAAATCAATGGCGTTGATTTGAGTTGGACTGTTGGTTCGATGCTTAGCGAGATT
ACTGAAATAGAAATTGATGATCAAGAAAAATTGACATTTAAAGACTTCTTTATTGCAGCA
TTGTCTGTTGCAATTTGTTGTATTTTATTATATATTGCCGGGTTAAGCGCTTCAATTGG
CTTTATATACGAAAAACCCGCAAATGTTATAA
```

Protein

>38737.m00006

```
MLLKSVEFNISVFNLEYIDRFVAMSSIIYTNKFFNLSRSSTLKEKLTQALDFCRKDWSL
LPDHITNISYSPTYCWKGYQYNVLSKGYKFKDSNVVIDKENKINGVDLSWTVGSMLSEI
TEIEIDDQEKLTFKDFFI AALSVAICCILLIYIAGFKRFNWLYIRKTRKML*
```

B) Purificação da NTPDase de *Trichomonas vaginalis*

Os nucleotídeos extracelulares desempenham um papel regulatório importante, influenciando funções de muitos sistemas e órgãos (Chow et al., 1997). Essas moléculas são principalmente liberadas pelas células em situações fisiológicas ou de estresse. As purinas extracelulares estão envolvidas em importantes e diversos efeitos em muitos processos biológicos, desde organismos unicelulares até órgãos e sistemas. Esses efeitos incluem contração do músculo liso, neurotransmissão, secreção exócrina e endócrina, resposta imune, inflamação, agregação plaquetária, dor e modulação da função cardíaca (Ralevic & Burnstock, 1998). Os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares podem agir como compostos sinalizadores por ligarem-se a receptores específicos, conhecidos como purinoceptores. Os receptores P2 reconhecem ATP, ADP, UTP e UDP e são classificados em P2X, que são canais iônicos, e P2Y, receptores associados a proteínas G (Ralevic & Burnstock, 1998). Os nucleotídeos extracelulares podem ser inativados por hidrólise via enzimas que constituem a família E-NTPDase (ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase) (Zimmermann, 2001). Uma atividade de nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase - NTPDase1 (CD39, ecto-apirase, ecto-ATP difosfoidrolase, EC 3.6.1.5) foi caracterizada em *T. vaginalis* (Matos et al., 2001).

Apesar de fatores limitantes como a baixa abundância nos tecidos e a perda de atividade quando solubilizadas em detergentes, nucleotidases foram purificadas e seqüenciadas em diversos organismos e tecidos, tais como pâncreas de suínos (LeBel et al., 1980), raízes de ervilha (Vara & Serrano, 1981), batata (Handa & Guidotti, 1996), pulmões bovinos (Sévigny et al., 1997a), vasos sanguíneos (Sévigny et al., 1997b), coração bovino

(Beaudoin et al., 1997), insetos (Valenzuela et al., 1998; Faudry et al., 2004), rins suínos (Lemmens et al., 2000), fígado de galinha (Knowles et al., 2002) e sinaptossomas de córtex de cérebro de suínos (Kukulski & Komoszynski, 2003). O objetivo deste estudo foi purificar a NTPDase presente em *T. vaginalis*.

Materiais e Métodos

Materiais. Nucleotídeos, tampão TRIZMA base, *N*- α -*p*-tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK), albumina sérica bovina, foram obtidos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA); DEAE Affi-Gel Blue e kit para coloração pela prata, da BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA), concanavalina A-Sepharose, da Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). Os demais reagentes utilizados apresentavam o mais alto grau de pureza.

Parasitas e condições de cultivo. O isolado clínico fresco de *T. vaginalis* T068-II foi cultivado durante, no máximo, uma semana a 37 °C através de passagens diárias no meio de tripticase-extrato de levedo-maltose (TYM) suplementado com soro de cavalo inativado pelo calor a 5% (Diamond, 1957).

Homogenato. Culturas contendo 10^{10} tricomonas foram lavadas três vezes com solução de NaCl (0.85%) e os organismos resuspendidos a um volume de 10 ml em Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 contendo o inibidor de proteases TLCK 1,0 mM, e a suspensão foi incubada em gelo durante 20 min. Os organismos foram lisados em um homogeneizador Dounce e o homogenato foi estocado a -70 °C com 15% de glicerol.

Solubilização e cromatografias em coluna. O homogenato foi solubilizado a 4°C por 5 min a uma concentração de proteína de 1,0 mg/ml em NP-40 a 0,1% em Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, e centrifugado por 1 h a 100.000 x g. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna de DEAE Affi-Gel Blue de 7,0 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro pré-equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 e NP-40 a 0,1%. As proteínas foram eluídas com um gradiente linear de NaCl de 0-0,15 M no mesmo tampão, seguido de uma lavagem de NaCl 2,0 M. Foi feito um *pool* das frações ativas, o qual foi dialisado contra Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, NP-40 a 0,05%. O dialisado foi aplicado em uma coluna de concanavalina A (Con A)-Sepharose de 4,0 cm de altura x 1,5 cm de comprimento, a um fluxo de 0,2 ml/min. A coluna foi lavada a 0,5 ml/min com Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, CaCl₂ 500 µM e NP-40 a 0,05%, e eluída a 1,0 ml/min com metilmanosídeo nas concentrações de 0,3, 0,5 e 1,0 M no mesmo tampão. Todas as etapas das cromatografias em coluna foram realizadas a 4°C.

Ensaio enzimático. As amostras de proteína eluídas das colunas foram pré-incubadas por 5 min a 37 °C em 200 µl de meio de incubação contendo tampão Tris 50 mM, pH 7,2 e CaCl₂ 5,0 mM. A reação enzimática foi iniciada com a adição dos substratos ATP e ADP, a uma concentração final de 1,0 mM. A hidrólise de ATP e ADP foi interrompida pela adição de 200 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (v/v). As amostras foram colocadas no gelo durante 10 min, seguindo a detecção da liberação de fosfato inorgânico (Pi) (Chan et al., 1986). O tempo de incubação e a concentração de proteína foram escolhidos para manter a linearidade das reações. Foram usados controles com a adição de proteína após a mistura de TCA para corrigir a hidrólise não enzimática dos substratos. A atividade específica é expressa como nmol Pi liberado/min/mg proteína.

Determinação da Proteína. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Coomassie Blue (Bradford, 1976), usando albumina sérica bovina como padrão.

Eletroforese SDS-PAGE. As amostras de proteína obtidas nas diferentes etapas da purificação foram analisadas em eletroforese sob condições desnaturantes em gel de acrilamida a 10% (SDS-PAGE), de acordo com Laemmli (1970). Volumes iguais das amostras e do tampão (SDS 4,0%, 2-mercaptoetanol 2,0%, glicerol 2,0%, bromofenol blue 0,001% e Tris 125 mM, pH 6,8) foram usados obtendo-se uma diluição final de 1:1 e levados à ebulição. As proteínas foram então fracionadas por SDS-PAGE e o gel foi corado pela prata.

Resultados e Discussão

A NTPDase de *T. vaginalis* está localizada na membrana plasmática (Tasca et al., 2004, Capítulo 3) e foi solubilizada em NP-40 e parcialmente purificada através de cromatografia de troca iônica (DEAE Affi-Gel Blue) e de afinidade (concanavalina-A). O esquema de purificação está resumido na Tabela 5.B.1. Após centrifugação, a solubilização do homogenato em NP-40 recuperou 82% das proteínas no sobrenadante, com 91% da atividade ATPásica e um aumento na atividade ADPásica de 104%. Esse aumento é atribuído ao efeito ativador do NP-40 na atividade da NTPDase, como já descrito (Caldwell et al., 1998; Knowles et al., 2002).

A atividade da NTPDase foi eluída da coluna de DEAE Affi-Gel Blue e recuperada no pico equivalente às frações 71 a 86 (Figura 5.B.1), que correspondeu a 52% da atividade total ATPásica e 92% da atividade total ADPásica, produzindo fatores de purificação de 2,6 e 4,8 para hidrólise do ATP e do ADP, respectivamente. O passo subsequente da separação cromatográfica em coluna de concanavalina-A (Figura 5.B.2) resultou em fatores de enriquecimentos na purificação iguais a 29 para atividade ATPásica e 38 para atividade ADPásica. A Figura 5.B.3 mostra a análise eletroforética obtida após cada etapa do processo de purificação. A amostra obtida no último passo da purificação apresentou inúmeras bandas e, de acordo com os baixos fatores de enriquecimento para as atividades ATPásica e ADPásica, os resultados indicam apenas uma purificação parcial, a qual deverá ser aumentada através de um protocolo otimizado.

Tabela 5.B.1. Purificação da NTPDase de *Trichomonas vaginalis*.

Etapa	Proteína total (mg)	Atividade total (nmol Pi/min/ml)		Atividade específica (nmol Pi/min/mg proteína)		Atividade Recuperada (%)		Fator de Purificação (vezes)	
		ATP	ADP	ATP	ADP	ATP	ADP	ATP	ADP
Homogenato	167	2,3	2,4	0,014	0,014	100		1,0	
Homogenato solubilizado em NP-40 a 0,1%	137	2,1	2,5	0,015	0,018	91	104	1,1	1,3
Coluna de DEAE Affi-Gel Blue (<i>pool</i>)	33	1,2	2,2	0,036	0,067	52	92	2,6	4,8
Coluna de Con-A (<i>pool</i>)	3	1,2	1,6	0,4	0,53	52	67	29	38

Cada determinação foi realizada em triplicata. Con-A, concanavalina-A. Foram realizados três experimentos e os dados demonstram um experimento representativo.

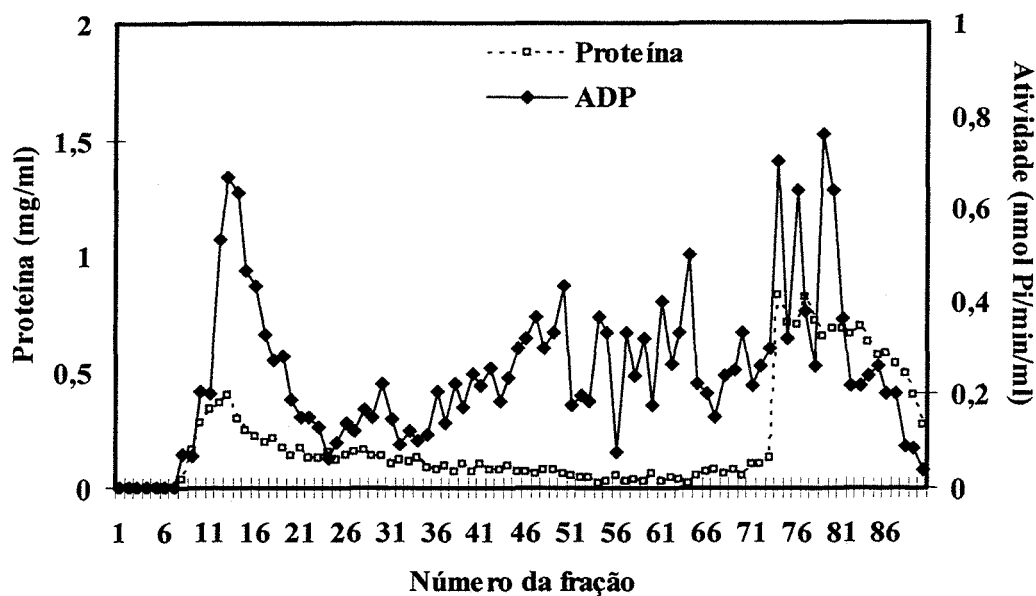


Figura 5.B.1. Cromatografia em coluna de DEAE Affi-Gel Blue, onde foi aplicado o sobrenadante obtido da solubilização do homogenato com NP-40 a 0,1%. As frações 71-81 foram eluídas com o gradiente de NaCl (0-0,13 M); as frações 82-90 foram lavadas com solução 2,0 M de NaCl. As condições da cromatografia estão descritas nos Materiais e Métodos. Frações de 5 ml foram coletadas. As frações 71-81 foram misturadas para a próxima etapa da purificação.

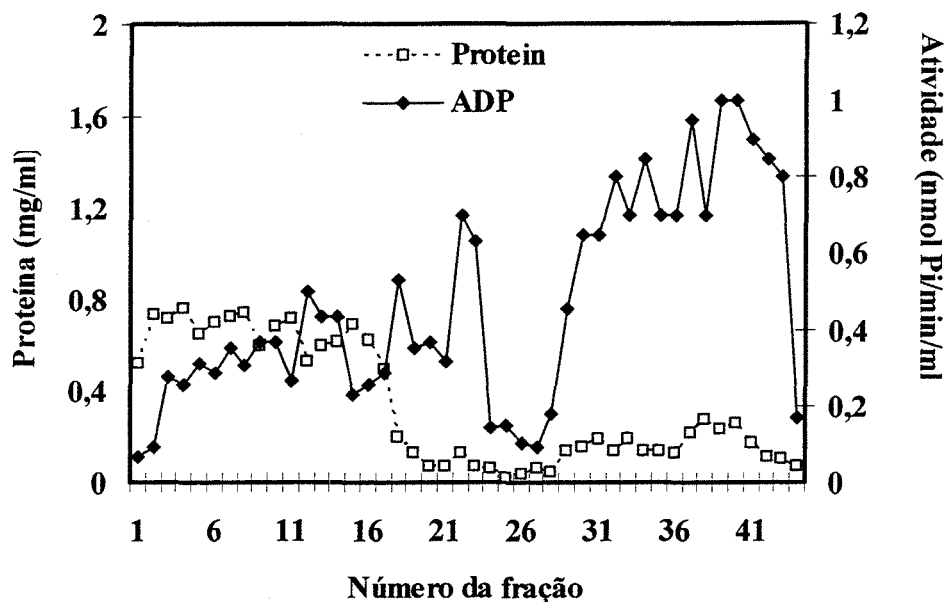


Figura 5.B.2. Cromatografia em coluna de Concanavalina-A-Sepharose onde foi aplicado o *pool* das frações ativas 71-81 obtidas na cromatografia com coluna de DEAE Affi-Gel Blue. As frações 30-43 foram eluídas com metilmanosídeo nas concentrações de 0,5 a 1,0 M. As condições da cromatografia estão descritas nos Materiais e Métodos. Frações de 3 ml foram coletadas. As frações 30-43 foram misturadas para análise em eletroforese SDS-PAGE.

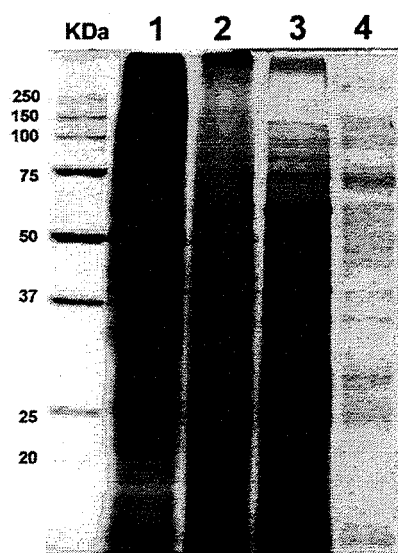


Figura 5.B.3. SDS-PAGE das frações obtidas no processo de purificação da NTPDase de *T. vaginalis*. As bandas correspondentes às proteínas foram coradas pela prata (BioRad). Os marcadores de peso molecular com os valores de massa molecular aparentes são mostrados no lado esquerdo, em kilodaltons. Linha 1: homogenato de *T. vaginalis*, 5 μ g; linha 2: sobrenadante do homogenato solubilizado com NP-40 a 0,1%, 14 μ g; linha 3: *pool* das frações com atividade obtidas na coluna de DEAE Affi-Gel Blue, 4 μ g; linha 4: *pool* das frações com atividade obtidas na coluna de concanavalina-A, 720 ng.

Referências Bibliográficas

- Beaudoin, A.R., Sévigny, J., Grondin, G., Daoud, S., Levesque, F.P. (1997). Purification, characterization, and localization of two ATP diphosphohydrolase isoforms in bovine heart. *American Journal of Physiology* 273, H673-681.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 218-254.
- Caldwell, C.C., Davis, M.D., Knowles, A.F. (1999). Ectonucleotidases of avian gizzard smooth muscle and liver plasma membranes: a comparative study. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 362, 46-58.
- Chan, K., Delfert, D. & Junger, K. D. (1986). A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 157, 375-380.
- Chow, S.C, Kass, G., Orrenius, S. (1997) Purines and their roles in apoptosis. *Neuropharmacology* 36, 1149-1156.
- Diamond, L. S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *Journal of Parasitology* 43, 488-490.
- Faudry, E., Lozzi, S.P., Santana, J.M., D'Souza,-Ault, M., Kieffer, S., Felix, C.R., Ricart, C.A., Sousa, M.V., Vernet, T., Teixeira, A.R. (2004). *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 19607-19613.
- Handa, M. & Guidotti, G. (1996). Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218, 916-923.

- Knowles, A.F., Nagy, A.K., Strobel, R.S., Wu-Weis, M. (2002). Purification, characterization, cloning, and expression of the chicken liver ecto-ATP-diphosphohydrolase. *European Journal of Biochemistry* 269, 2373-2382.
- Kukulski, F. & Komoszynski, M. (2003). Purification and characterization of NTPDase1 (ecto-apyrase) and NTPDase2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes. *European Journal of Biochemistry* 270, 3447-3454.
- Laemmli, K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LeBel, D., Poirier, G.G., Phaneuf, S., St-Jean, P., Laliberte, J.F., Beaudoin, A.R. (1980). Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. *The Journal of Biological Chemistry* 255, 1227-1233.
- Lemmens, R., Kupers, L., Sévigny, J., Beaudoin, A.R., Grondin, G., Kittel, A., Waelkens, E., Vanduffel, L. (2000). Purification, characterization, and localization of an ATP diphosphohydrolase in porcine kidney. *American Journal of Physiology – Renal Physiology* 278, F978-988.
- Matos, J.A.A., Borges, F.P., Tasca, T., Bogo, M.R., De Carli, G.A., Fauth, M.G., Dias, R.D., Bonan, C.D. (2001). Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology* 31, 770-775.
- Ralevic, V. & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacology Reviews* 50, 413-492.

- Sévigny, J., Levesque, F.P., Grondin, G., Beaudoin, A.R. (1997a). Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques. *Biochimica et Biophysica Acta* 1334, 73-88.
- Sévigny, J., Picher, M., Grondin, G., Beaudoin, A.R. (1997b). Purification and immunohistochemical localization of the ATP diphosphohydrolase in bovine lungs. *American Journal of Physiology* 272, L939-950.
- Tasca, T., Bonan, C.D., De Carli, G.A., Sarkis, J.J. (2004). *Trichomonas vaginalis*: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability. *Parasitology Research* 93, 300-3.
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Galperin, M.Y., Ribeiro, J.M. (1998). Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*. A new type of nucleotide-binding enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 30583-30590.
- Vara, F. & Serrano, R. (1981). Purification and characterization of a membrane-bound ATP diphosphohydrolase from *Cicer arietinum* (chick-pea) roots. *Biochemistry Journal* 197, 637-643.
- Zimmermann, H. (2001). Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. *Drug Development Research* 52, 44-56.

III. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados revelam a presença de uma cadeia enzimática em *T. vaginalis*, composta pela NTPDase1 (Matos et al., 2001) e pela ecto-5'-nucleotidase, ambas as enzimas apresentando ecto-localização e heterogeneidade entre os diferentes isolados investigados.

As propriedades cinéticas da ecto-5'-nucleotidase foram descritas em trofozoítos intactos de dois isolados de *T. vaginalis* (Tasca et al., 2003a, Capítulo 1). A atividade de hidrólise é dependente de cátions divalentes, magnésio e cálcio e é máxima em pH alcalino. Para ambos os isolados de *T. vaginalis* investigados, os valores de K_m (Constante de Michaelis) situam-se na faixa micromolar, com ampla especificidade a nucleosídeos monofosfatados. A influência de outras enzimas passíveis de hidrolisar esses substratos foi descartada pelo emprego de inibidores específicos de fosfatase alcalina, levamisole e tetramisole, e pela adição de AMP cíclico no ensaio enzimático, eliminando a possibilidade do aumento na concentração do AMP produzido por uma fosfodiesterase (Tasca et al., 2003a, Capítulo 1). No entanto, a atividade de ecto-5'-nucleotidase em *T. vaginalis* foi inibida pelo 5'-[α,β -metileno]difosfato (AMPCP), inibidor específico da enzima em vertebrados. Além disso, os dois isolados de *T. vaginalis* investigados apresentaram algumas diferenças nos parâmetros cinéticos, o que está de acordo com outros estudos que mostraram a variabilidade entre diferentes isolados nas propriedades virulentas, antigênicas, na distribuição geográfica e na análise isoenzimática (Hogue, 1943; Kotcher & Hoogasian, 1957; Kott & Alder, 1961; Christian et al.,

1963; Kulda, 1967; Farris & Honigberg, 1970; Alderete, 1983; Torian et al., 1984; Alderete et al., 1985; Krieger et al., 1985).

Em vertebrados, a ecto-5'-nucleotidase está presente em praticamente todos os tecidos, mas não em todos os tipos de células. As conseqüências fisiológicas da eliminação do ATP e/ou produção de adenosina célula- ou tecido-específicas variam, desde que ambos ATP e adenosina apresentam funções fisiológicas mediadas por receptores (Zimmermann, 1992). A adenosina induz vasodilatação, decréscimo no fluxo de filtração glomerular, inibição da liberação de neurotransmissores, inibição da resposta imune e inflamatória. Nos organismos mais primitivos, a 5'-nucleotidase bacteriana apresenta uma função ecológica na reciclagem de nutrientes nos habitats aquáticos (Zimmermann, 1992).

A presença de uma NTPDase e de uma ecto-5'-nucleotidase em *T. vaginalis* permite a hidrólise de ATP, ADP e AMP e pode ser importante para a modulação da concentração de nucleotídeos no espaço extracelular, protegendo o parasito dos efeitos citolíticos dos nucleotídeos, principalmente ATP. Além disso, *T. vaginalis* é incapaz de sintetizar purinas e pirimidinas *de novo* e seu crescimento e sobrevivência depende das vias de salvação para gerar nucleotídeos (Heyworth et al. 1982; 1984). Harris et al. (1988) postularam que *T. vaginalis* pode conter dois carreadores separados para o transporte de adenosina, guanosina e uridina. Ambos carreadores têm mais de um sítio de ligação para nucleosídeos. O primeiro carreador tem sítios para adenosina e nucleosídeos pirimídicos, e um separado para nucleosídeos púricos. O segundo carreador tem um sítio para adenosina e uridina e um separado para guanosina, e a taxa de recaptção de nucleosídeos por

T. vaginalis é suficiente para sustentar o crescimento. A salvação de purinas é mediada por nucleosídeo fosforilases e quinases (Miller & Lindstead, 1983), enquanto fosforibosiltransferases e nucleosídeo quinases são capazes de recuperar pirimidinas (Wang & Cheng, 1984). A cadeia enzimática que hidrolisa nucleotídeos extracelulares presente em *T. vaginalis* pode contribuir para os mecanismos de escape do parasito da resposta imune do hospedeiro através da degradação do ATP e para a produção de adenosina necessária para o crescimento do parasito. Portanto, a NTPDase1 e a ecto-5'-nucleotidase podem ser consideradas como alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da tricomonose.

Os medicamentos mais usados no tratamento da tricomonose são o metronidazol (primeira escolha) e o tinidazol, nos casos de isolados de *T. vaginalis* metronidazol-resistentes. Neste estudo, foi testado o efeito *in vitro* do metronidazol e do tinidazol na atividade da NTPDase1 e da ecto-5'-nucleotidase de um isolado de *T. vaginalis* proveniente da ATCC cultivado por longo período no laboratório e de um isolado clínico fresco (Tasca et al., 2003b, Capítulo 2). É importante observar que a atividade de ecto-5'-nucleotidase não apresentou diferenças significativas entre os dois isolados de *T. vaginalis*. Entretanto, as hidrólises de ATP e ADP apresentaram-se significativamente elevadas no isolado clínico fresco quando comparadas ao isolado da ATCC. Esses resultados demonstram um provável envolvimento da NTPDase1 nos mecanismos patogênicos do parasito, considerando-se o curto período de tempo de cultivo *in vitro*, no qual o isolado clínico mantém as características biológicas semelhantes às encontradas no

sítio do hospedeiro. Por outro lado, isolados da ATCC cultivados por longos períodos no laboratório podem apresentar alterações no metabolismo bioquímico, incluindo alterações nos mecanismos patogênicos (Lehker et al., 1991).

O metronidazol e o tinidazol produziram diferentes efeitos *in vitro* nas atividades das enzimas dos isolados de *T. vaginalis*. A hidrólise do ATP foi ativada na presença do metronidazol no isolado da ATCC, enquanto foi inibida pelo tinidazol no isolado clínico fresco (Tasca et al., 2003b, Capítulo 2). Esses efeitos provocados pelos derivados nitroimidazóis na hidrólise do ATP podem ser o resultado de uma interação farmacológica entre a NTPDase1 e os fármacos testados. A fim de explicar a ativação e a inibição da hidrólise do ATP pelo metronidazol e tinidazol, respectivamente, duas possibilidades podem ser sugeridas: 1) esses efeitos envolvem a participação de uma ecto-ATPase, co-expressa com a NTPDase1 em *T. vaginalis*, como observado em cérebro de ratos (Kegel et al., 1997), ou 2) esses efeitos ocorreram somente na atividade ATPásica da NTPDase1.

O tratamento dos parasitos na presença de metronidazol durante 2 horas inibiu as atividades ATPásica e ADPásica em ambos os isolados. Por outro lado, o tratamento dos organismos durante 2 horas com tinidazol inibiu a hidrólise de ATP e ADP somente no isolado clínico fresco. Nas condições testadas, os medicamentos não produziram alterações nas atividades da ecto-5'-nucleotidase de ambos os isolados (Tasca et al., 2003b, Capítulo 2). A inibição da atividade da NTPDase1 após o tratamento com os fármacos ocorreu provavelmente como uma resposta a um ambiente adverso, na tentativa do parasito em modular a concentração de nucleotídeos no meio extracelular. Esse fenômeno pode estar envolvido em

mecanismos de transdução de sinal, visto que as enzimas envolvidas participam da degradação do ATP à adenosina, produzindo efeitos diversos dependentes da concentração do nucleotídeo e do nucleosídeo extracelular e da sua ligação com receptores específicos.

Vários estudos mostraram alterações nas atividades de enzimas citosólicas e hidrogenossomais de *T. vaginalis* relacionadas ao desenvolvimento de resistência ao metronidazol (Kulda, 1999). Enzimas hidrogenossomais, como piruvato:ferredoxina oxidoreductase, hidrogenase, enzima málica (L-malato:NAD(P) oxidoreductase hidrogenossomal) e NAD:ferredoxina oxidoreductase apresentaram atividades reduzidas em isolados metronidazol-resistentes (Drmota et al., 1996; Steinbuchel & Müller, 1989). Por outro lado, as enzimas citosólicas lactato desidrogenase e piruvato quinase apresentaram atividades aumentadas em tricomonas resistentes ao metronidazol (Cerkasovova et al., 1988; Mertens et al., 1992). Neste estudo, foi investigado o comportamento das enzimas envolvidas na hidrólise de nucleotídeos extracelulares em isolados de *T. vaginalis* sensíveis aos nitroimidazóis, após interação farmacológica com metronidazol e tinidazol. Os resultados encontrados revelaram diferenças entre os dois isolados testados, reforçando a importância do uso de isolados clínicos frescos nas investigações, em adição a isolados cultivados por longos períodos. Além disso, os dados indicam a função da NTPDase1 como moduladora da concentração de nucleotídeos extracelulares na presença de metronidazol e tinidazol, uma condição adversa para o parasito.

Uma vez que a NTPDase1 e a ecto-5'-nucleotidase hidrolisam nucleotídeos extracelulares, foi investigada a localização celular dessas enzimas em trofozoítos intactos de *T. vaginalis* (Tasca et al., 2004, Capítulo 3). Ambas as enzimas demonstraram ecto-localização, confirmando os mecanismos presentes no parasito capazes de realizar hidrólise extracelular de nucleotídeos, como descrito nos estudos cinéticos (Matos et al. 2001; Tasca et al. 2003a, Capítulo 1). A adição de inibidores excluiu a influência de outras enzimas que hidrolisam nucleotídeos, como fosfatases alcalina e ácida, $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase e Na^+/K^+ -ATPase. Paralelamente à determinação da localização das enzimas, foi investigada a viabilidade celular do *T. vaginalis* na presença de diferentes concentrações de nucleotídeos e do nucleosídeo da adenina (Tasca et al., 2004, Capítulo 3). Os resultados demonstraram que, mesmo elevadas concentrações de nucleotídeos da adenina e de adenosina não exerceram efeitos citolíticos nos trofozoítos. A localização das ectonucleotidases na superfície da membrana plasmática de *T. vaginalis* é uma importante contribuição para a compreensão do envolvimento dessas enzimas em algumas funções fisiológicas do parasito.

Estudos têm mostrado que o ATP extracelular pode agir como um composto sinalizador em mecanismos citotóxicos (Filippini et al. 1990; Steinberg and Di Virgilio 1991). A concentração de nucleotídeos livres púricos encontrados na vagina humana, o habitat natural do *T. vaginalis*, originados pela descamação e lise das células epiteliais durante a infecção pode atingir 10 mM, sendo que 90% corresponde a nucleotídeos da adenina (Munagala & Wang, 2003). Considerando os altos níveis de nucleotídeos extracelulares, a presença de enzimas hidrolisando

ATP, ADP e AMP é essencial para a sobrevivência do parasito em um ambiente hostil e sob constantes alterações, através da modulação da concentração de nucleotídeos no espaço extracelular e da proteção dos efeitos citolíticos do ATP extracelular. Diferentes concentrações de ATP, ADP, AMP e adenosina não exerceram efeitos citolíticos nos parasitos, sendo provavelmente modulados por inativação através da cadeia enzimática composta pela NTPDase1 e pela ecto-5'-nucleotidase (Tasca et al., 2004, Capítulo 3).

Modulação da concentração de nucleotídeos no espaço extracelular, proteção dos efeitos citolíticos do ATP e participação nas vias de salvação de nucleosídeos são alguns aspectos fisiológicos do *T. vaginalis* que envolvem a hidrólise do ATP. O *T. vaginalis*, assim como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp., não é capaz de realizar síntese *de novo* de purinas e pirimidinas e seu crescimento depende das vias de salvação para gerar nucleotídeos (Heyworth et al. 1982; 1984; Wang 1990). Considerando os altos níveis de nucleotídeos púricos no sítio do *T. vaginalis*, a ausência de efeitos citolíticos nos parasitos e a ecto-localização das enzimas envolvidas na hidrólise de nucleotídeos, sugere-se que a NTPDase1 e a ecto-5'-nucleotidase modulam as concentrações extracelulares de ATP, ADP e AMP. O produto final dessas reações, o nucleosídeo adenosina, é recaptado pelas vias de salvação. Recentemente, Munagala & Wang (2003) mostraram que a adenosina é o precursor primário do *pool* de nucleotídeos púricos em *T. vaginalis*, e identificaram atividades de adenosina deaminase, IMP desidrogenase e GMP sintetase nos parasitos, sugerindo uma rota metabólica capaz de converter adenina a GMP via adenosina.

Visto que a adenosina tem importância primordial na salvação de purinas em *T. vaginalis*, pode-se considerar a NTPDase1 e a ecto-5'-nucleotidase essenciais para as estratégias de sobrevivência do parasito durante a exposição a nucleotídeos extracelulares, principalmente ATP. Portanto, essas enzimas produzem adenosina e contribuem para a aquisição do nucleosídeo através das vias de salvação e a ecto-localização das enzimas é fundamental para a realização dessas funções (Figura III.1).

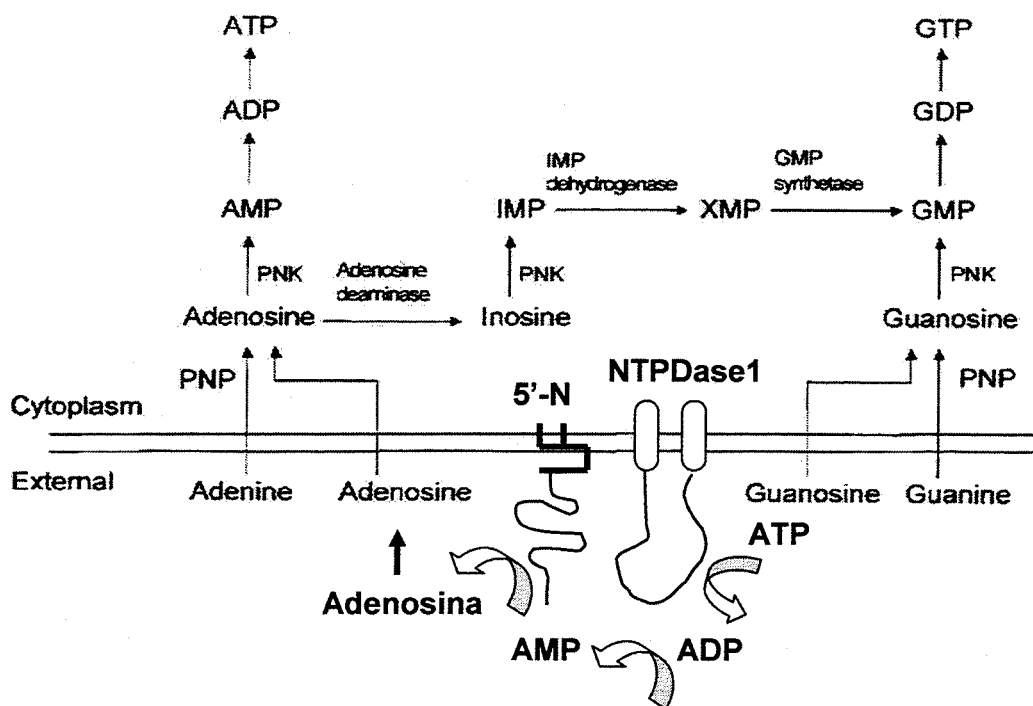


Figura III.1. Esquema das vias de salvação de purinas em *T. vaginalis*, incluindo a NTPDase1 (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase1) e a ecto-5'-nucleotidase (5'-N). PNK: *purine nucleoside kinase*; PNP: *purine nucleoside phosphorylase* [adaptado de Munagala, N.R. & Wang, C.C. (2003). Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 127: 143-149].

O estudo utilizando um maior número de isolados de *T. vaginalis* contribuiu para a confirmação de que as atividades ATPásica e ADPásica apresentam-se mais elevadas em isolados clínicos frescos em comparação a isolados cultivados por longos períodos (Capítulo 4). A heterogeneidade foi demonstrada entre os diferentes isolados de *T. vaginalis* com relação à razão de hidrólise ATP:ADP (Capítulo 4). Alguns isolados apresentaram razão de hidrólise ATP:ADP igual a 1:0,8, característica de NTPDase1, enquanto outros isolados apresentaram uma razão de hidrólise ATP:ADP de aproximadamente 2:1. As diferentes razões de hidrólise ATP:ADP podem ser devidas a alterações estruturais na enzima, o que leva a distintas preferências por substratos (Zimmermann, 2001). Existem relatos de razões de hidrólise ATP:ADP de 2:1 para sinaptossomas de cérebro de rato (Battastini et al., 1991), e a NTPDase8 foi recentemente identificada como responsável por essa razão de hidrólise (Bigonnesse et al., 2004). Fietto et al. (2004) encontraram diferentes razões de hidrólise ATP:ADP da NTPDase de epimastigotas (1:1) e de tripomastigotas (2:1) de *Trypanosoma cruzi*. Estudos futuros poderão esclarecer se os isolados de *T. vaginalis* apresentam diferentes NTPDases.

A ecto-5'-nucleotidase é o membro da cadeia enzimática responsável pela produção de adenosina. Os isolados de *T. vaginalis* apresentaram profundas diferenças nos níveis de atividade da ecto-5'-nucleotidase e, surpreendentemente, alguns isolados apresentaram muito baixa ou nenhuma atividade (Capítulo 4). O *T. vaginalis* depende das vias de salvação para gerar nucleotídeos (Heyworth et al., 1982; 1984) e a adenosina é o precursor primário do *pool* de nucleotídeos púricos

(Munagala & Wang, 2003). Portanto, poderia ser sugerido que a NTPDase e a ecto-5'-nucleotidase são essenciais para produzir adenosina e para o parasito adquirir o nucleosídeo através das vias de salvação. Porém, alguns isolados não apresentaram atividade de ecto-5'-nucleotidase e não produziram adenosina. Diferentes condições de cultivo foram testadas e não apresentaram efeitos na elevação dos níveis da atividade enzimática. Algumas hipóteses podem ser sugeridas, como a presença de um erro na transcrição e/ou tradução dessa proteína, ou a proteína expressa pode ser funcionalmente silenciada devido a uma mutação. A ausência de atividade de hidrólise de AMP pelo *T. vaginalis* pode causar importantes conseqüências para ambos hospedeiro e parasito durante a infecção. A adenosina é um agente anti-inflamatório que se liga a receptores específicos para regular as conseqüências da inflamação (Cronstein et al., 1992; Bouma et al., 1997; Haskó & Cronstein, 2004). Portanto, níveis reduzidos de adenosina podem resultar na produção de sintomas agudos devido à infiltração leucocitária em pacientes infectados com isolados ecto-5'-nucleotidase-deficientes (Figura III.2).

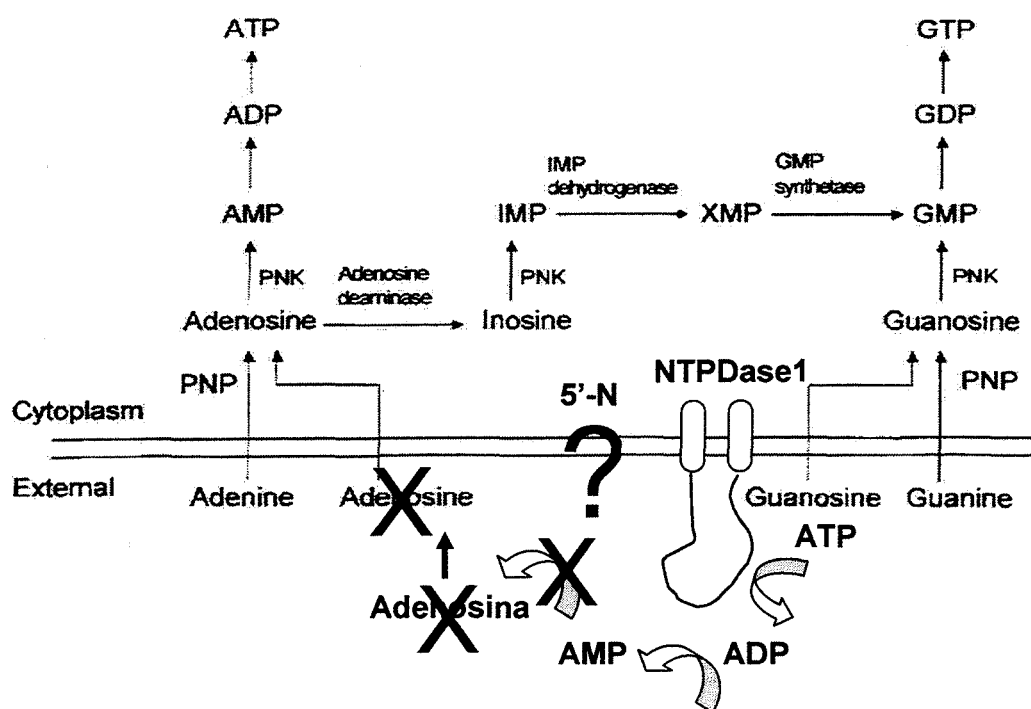


Figura III.2. Esquema das vias de salvação de purinas em *T. vaginalis*, incluindo a NTPDase1 (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase1) e destacando a ausência da ecto-5'-nucleotidase (5'-N). PNK: *purine nucleoside kinase*; PNP: *purine nucleoside phosphorylase* [adaptado de Munagala, N.R. & Wang, C.C. (2003). Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 127: 143-149].

O *T. vaginalis* pode modular os níveis de nucleotídeos em resposta a fatores externos, como o ferro. Estudos mostraram que o crescimento e a multiplicação do parasito são dependentes desse composto (Lehker & Alderete, 1992; Gorrell, 1985; Alderete, 1999). Além disso, o ferro modula a expressão de fatores de virulência de *T. vaginalis*, tais como adesinas (Garcia et al., 2003; Alderete et al., 2004) e proteinases (Alderete et al., 1995). O cultivo dos parasitos em meio de cultura com e sem a adição de ferro não apresentou efeitos dramáticos na atividade da NTPDase dos diferentes isolados (Capítulo 4). Ao contrário, concentrações baixas e

elevadas de ferro apresentaram decréscimo e aumento, respectivamente, na atividade da ecto-5'-nucleotidase daqueles isolados que apresentaram atividade sob condições normais de cultivo. Esses resultados sugerem duas vantagens para o parasito: a) produção da adenosina imuno-modulatória para atenuar a resposta inflamatória do hospedeiro induzida pelas elevadas taxas de crescimento e multiplicação do *T. vaginalis* em um ambiente rico em ferro, e b) recaptção da adenosina, importante nucleosídeo gerador do *pool* de nucleotídeos em *T. vaginalis*, através das vias de salvação (Figura III.3).

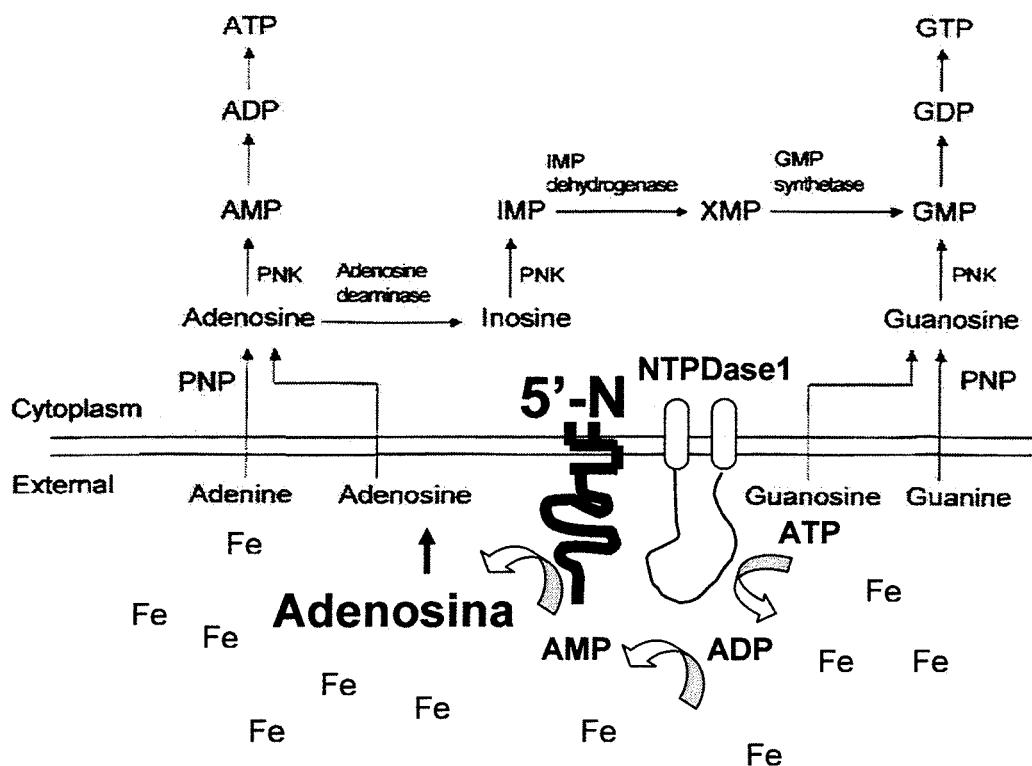


Figura III.3. Esquema das vias de salvação de purinas em *T. vaginalis*, incluindo a NTPDase1 (nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase1) e destacando o efeito do ferro no aumento da atividade da ecto-5'-nucleotidase (5'-N). PNK: *purine nucleoside kinase*; PNP: *purine nucleoside phosphorylase* [adaptado de Munagala, N.R. & Wang, C.C. (2003). Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 127: 143-149].

A NTPDase1 e a ecto-5'-nucleotidase ainda podem estar envolvidas na sinalização celular que regula a adesão às células vaginais epiteliais, como já demonstrado para linfócitos (Airas et al., 1995; Kansas et al., 1991). A não disponibilidade de anticorpos específicos ou enzimas purificadas impede, no momento, a realização experimental para testar as hipóteses sugeridas. Análises de bancos genômicos utilizando seqüências conhecidas dessas enzimas (Resta et al., 1993; Maliszewski et al., 1994; Asai et al., 1995; Vasconcelos et al., 1996; Fietto et al., 2004) não revelaram nenhuma seqüência homóloga à NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis*. Certamente, estudos futuros envolvendo a busca da purificação das proteínas, obtenção de anticorpos, amplificação dos genes e produção de proteínas recombinantes contribuirão significativamente para o entendimento da função da NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase na biologia do *T. vaginalis*.

IV. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados apresentados neste estudo demonstram a caracterização das enzimas envolvidas na hidrólise extracelular de nucleotídeos em *T. vaginalis*. A NTPDase e a ecto-5'-nucleotidase apresentam ecto-localização e heterogeneidade entre os diferentes isolados investigados. Os dados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. A presença de uma atividade de ecto-5'-nucleotidase em *T. vaginalis* em adição à NTPDase1 previamente caracterizada (Matos et al., 2001), constitui uma cadeia enzimática que degrada ATP à adenosina.
2. Considerando experimentos realizados *in vitro*, o metronidazol e o tinidazol apresentaram efeitos diversos na atividade da NTPDase1 de um isolado de *T. vaginalis* proveniente da ATCC cultivado por longo período no laboratório e de um isolado clínico fresco. Os fármacos não produziram efeitos significativos na atividade da ecto-5'-nucleotidase de ambos os isolados de *T. vaginalis*. Os dados indicam a função da NTPDase1 como moduladora da concentração de nucleotídeos extracelulares na presença de metronidazol e tinidazol, uma condição adversa para o parasito.
3. A NTPDase1 e a ecto-5'-nucleotidase de *T. vaginalis* apresentam ecto-localização e a participação dessas enzimas na sinalização celular é sugerida, visto

que elas modulam os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, influenciando os efeitos induzidos pelos purinoceptores. Outro papel fisiológico sugerido para essas enzimas é o envolvimento na proteção do parasito dos efeitos citolíticos do ATP, visto que diferentes concentrações de ATP, ADP, AMP e adenosina não produziram efeito citolítico em *T. vaginalis*. Além disso, considerando o fato de que *T. vaginalis* não realiza síntese *de novo* de purinas e pirimidinas, as enzimas participam das vias de salvação fornecendo os nucleosídeos, principalmente adenosina.

4. As atividades da NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase apresentaram heterogeneidade na comparação de isolados clínicos frescos e isolados cultivados por longos períodos no laboratório. Os isolados clínicos frescos apresentaram hidrólise de ATP e ADP mais elevadas quando comparadas aos isolados de laboratório.

5. A heterogeneidade foi demonstrada com relação às diferentes razões de hidrólise ATP:ADP nos isolados clínicos frescos. Alguns isolados apresentaram razão de hidrólise ATP:ADP igual a 1:0,8, característica de NTPDase1, enquanto outros isolados apresentaram uma razão de hidrólise ATP:ADP de aproximadamente 2:1. Estudos futuros poderão esclarecer se os isolados de *T. vaginalis* apresentam diferentes NTPDases.

6. Os isolados de *T. vaginalis* apresentaram profundas diferenças nos níveis de atividade da ecto-5'-nucleotidase e, surpreendentemente, alguns isolados apresentaram muito baixa ou nenhuma atividade em diferentes condições de cultivo. A ausência de atividade de hidrólise de AMP pelo *T. vaginalis* pode causar importantes conseqüências para ambos, hospedeiro e parasito durante a infecção. A adenosina pode apresentar ação anti-inflamatória e seus níveis reduzidos podem resultar na produção de sintomas agudos devido à infiltração leucocitária em pacientes infectados com isolados ecto-5'-nucleotidase-deficientes.

7. O cultivo dos parasitos em meio de cultura com e sem a adição de ferro apresentou decréscimo e aumento, respectivamente, na atividade da ecto-5'-nucleotidase daqueles isolados que apresentaram atividade sob condições normais de cultivo. Esses resultados sugerem uma modulação do ferro na expressão da quantidade e/ou atividade da enzima.

8. A cadeia enzimática presente em *T. vaginalis* composta pela NTPDase e pela ecto-5'-nucleotidase, modula os níveis de nucleotídeos extracelulares e pode contribuir para os mecanismos de escape do parasito através da degradação do ATP e para a produção de adenosina necessária para a sobrevivência e crescimento do parasito. Portanto, a NTPDase e a ecto-5'-nucleotidase podem ser consideradas como alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da tricomonose. Além disso, a ausência de atividade da ecto-5'-

nucleotidase em alguns isolados pode constituir-se em um marcador biológico para o diagnóstico e identificação de isolados.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Airas, L., Hellman, J., Salmi, M., Bono, P., Puurunen, T., Smith, D. J., Jalkanen, S. (1995). CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. **Journal of Experimental Medicine** 182: 1603-1608.
- Alderete, J.F. (1983). Antigen analysis of several pathogenic strains of *Trichomonas vaginalis*. **Infection and Immunity** 39: 1041-1047.
- Alderete, J.F., Suprun-Brown, L., Kasmala, L., Smith, J., Spence, M., (1985). Heterogeneity of *Trichomonas vaginalis* and discrimination among trichomonal isolates and subpopulations with sera of patients and experimentally infected mice. **Infection and Immunity** 49: 463-468.
- Alderete, J.F., Kasmala, L., Metcalfe, E., Garza, G.E. (1986). Phenotypic variation and diversity among *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation of phenotype with trichomonal virulence determinants. **Infection and Immunity** 53: 285-293.
- Alderete, J.F. (1987). *Trichomonas vaginalis* NYH286 phenotypic variation may be coordinated for a repertoire of trichomonad surface immunogens. **Infection and Immunity** 55: 1957-1962.
- Alderete, J.F. & Garza, G.E. (1988). Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. **Infection and Immunity** 56: 28-33.
- Alderete, J.F., Provenzano, D., Lehker, M.W. (1995). Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. **Microbial Pathogenesis** 19: 93-103.
- Alderete, J.F., Engbring, J., Lauriano, C.M., O'Brien, J.L. (1998). Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron. **Microbial Pathogenesis** 24: 1-16.
- Alderete, J.F. (1999). *Trichomonas vaginalis*, a model mucosal parasite. **Reviews in Medical Microbiology** 10: 165-173.
- Alderete, J.F., Millsap, K.W., Lehker, M.W., Benchimol, M. (2001). Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. **Cellular Microbiology** 3: 359-370.
- Alderete, J.F., Benchimol, M., Lehker, M.W., Crouch, M.-L. (2002). The complex fibronectin-*Trichomonas vaginalis* interactions and trichomonosis. **Parasitology International** 51: 285-292.

- Alderete, J.F., Nguyen, J., Mundodi, V., Lehker, M.W. (2004). Heme-iron increases levels of AP65-mediated adherence by *Trichomonas vaginalis*. **Microbial Pathogenesis** 36: 263-271.
- Arroyo, R., Engbring, J., Alderete, J.F. (1993). Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. **Molecular Microbiology** 6: 853-862.
- Asai, T., O'Sullivan, W.J., Tatibana, M. (1983). A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry** 258: 6816-6822.
- Asai, T. & Suzuki, Y. (1990). Remarkable activities of nucleoside triphosphate hydrolase in the tachyzoites of both virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. **FEMS Microbiology Letters** 72: 89-92.
- Asai, T., Miura, S., Sibley, L.D., Okabayashi, H. & Takeuchi, T. (1995). Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry** 270: 11391-7.
- Barros, F.S., De Menezes, L.F., Pinheiro, A.A.S., Silva, E.F., Lopes, A.H.C.S., De Souza, W., Meyer-Fernandes, J.R. (2000). Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 375: 304-314.
- Battastini, A.M., da Rocha, J.B., Barcellos, C.K., Dias, R.D., Sarkis, J.J. (1991). Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. **Neurochemistry Research** 16: 1303-10.
- Beach, D.H., Holz, Jr G.G., Singh, B.N., Lindmark, D.G. (1990). Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 38: 175-190.
- Beaudoin, A.R., Sévigny, J., Grondin, G., Daoud, S., Levesque, F.P. (1997). Purification, characterization, and localization of two ATP diphosphohydrolase isoforms in bovine heart. **American Journal of Physiology** 273: H673-681.
- Benchimol, M. & de Souza, W. (1983). Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. **Journal of Protozoology** 30:422-425.
- Berrêdo-Pinho, M., Peres-Sampaio, C.E., Chrispim, P.P.M., Belmont-Firpo, R., Lemos, A.P., Martiny, A., Vannier-Santos, M.A., Meyer-Fernandes, J.R. (2001). A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 391: 16-24.

- Biederbick, A., Kosan, C., Kunz, J., Elsasser, H.P. (2000). First apyrase splice variants have different enzymatic properties. **The Journal of Biological Chemistry** 275: 19018-19024.
- Bigonnesse, F., Levesque, S.A., Kukulski, F., Lecka, J., Robson, S.C., Fernandes, M.J., Sévigny, J. (2004). Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry** 43: 5511-9.
- Bouma, M.G., Jeunhomme, T.M.M.A., Boyle, D.L., Dentener, M.A., Voitenok, N.N., van den Wildenberg, F.A.J.M., Buurman, W.A. (1997). Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. **Journal of Immunology** 158: 5400-5408.
- Bowden, F.J. & Gamett, G.P. (1999). Why is *Trichomonas vaginalis* ignored? **Sexually Transmitted Infections** 75: 372-374.
- Brugerolle, G., Bricheux, G., Coffe, G. (2000). Immunolocalization of two hydrogenosomal enzymes of *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology Research** 86: 30-35.
- Caldas, M.L. & Wasserman, M. (2001). Cytochemical localisation of calcium ATPase activity during the erythrocytic cell cycle of *Plasmodium falciparum*. **International Journal for Parasitology** 31: 776-782.
- Cates, W.Jr. (1999). Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel. **Sexually Transmitted Diseases** 26: S2-7.
- Cerkasovova, A., Novak, J., Cerkasov, J., Kulda, J., Tachezy, J. (1988). Metabolic properties of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole under anaerobic conditions. **Acta Universalis Carolinae – Biology** 30: 505-512.
- Chesson, H.W., Blandford, J.M., Pinkerton, S.D. (2004). Estimates of the annual number and cost of new HIV infections among women attributable to trichomoniasis in the United States. **Sexually Transmitted Diseases** 31: 547-551.
- Chow, S.C, Kass, G., Orrenius, S. (1997) Purines and their roles in apoptosis. **Neuropharmacology** 36: 1149-1156.
- Chevillard, C., Cárdenas, M.L., Cornish-Bowden, A. (1993). The competition plot: a sample test of whether two relations occur at the same active site. **Biochemistry Journal** 289: 599-604.

- Christian, R.T., Miller, N.F., Ludovici, P.P., Riley, G.M. (1963). A study of *Trichomonas vaginalis* in human cell culture. **American Journal of Obstetrics and Gynecology** 85: 947-954.
- Coimbra, E.S., Goncalves-da-Costa, S.C., Corte-Real, S., De Freitas, F.G.R., Durao, A.C., Souza, C.S.F., Silva-Santos, M.I., Vasconcelos, E.G. (2002). Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitology** 124: 137-143.
- Cotch, M.F., Pastorek II, J.G., Nugent, R.P., Yerg, D.E., Martin, D.H., Eschenbach, D.A. (1991). Demographic and behavioral predictors of *Trichomonas vaginalis* infection among pregnant women. **Obstetrics and Gynecology** 78: 1087-1092.
- Cotch, M.F., Pastorek II, J.G. 2nd, Nugent, R.P., Hillier, S.L., Gibbs, R.S., Martin, D.H., Eschenbach, D.A., Edelman, R., Carey, J.C., Regan, J.A., Krohn, M.A., Klebanoff, M.A., Rao, A.V., Rhoads, G.G. (1997). *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. **Sexually Transmitted Diseases** 24: 353-60.
- Cronstein, B.N., Levin, R.I., Philips, M., Hirschhorn, R., Abramson, S.B., Weissman, G. (1992). Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. **Journal of Immunology** 148: 2201-2206.
- Crouch, M.L.V., Benchimol, M., Alderete, J.F. (2001). Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* is influenced by iron and calcium. **Microbial Pathogenesis** 31: 131-144.
- Cunha, R.A. & Ribeiro, J.A. (2000). ATP as a presynaptic modulator. **Life Sciences** 68: 119-137.
- Dailey, D.C. & Alderete, J.F. (1990). Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. **Parasitology** 101:171-175.
- De Carli, G.A., Saraiva, P.J., Saraiva, O.J. (1992). Diagnóstico da tricomoníase pelo teste da imunofluorescência indireta. **Revista Brasileira de Análises Clínicas** 24: 100-102.
- De Carli, G.A. (1993). In PouchTMTV um novo método de cultura para o diagnóstico da tricomoníase urogenital. **Revista Brasileira de Análises Clínicas** 25: 35-36.
- De Carli, G.A. (2000). *Trichomonas*. In: Neves DP. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, p.101-105.

- De Carli, G.A. & Tasca, T. (2001a). Diagnóstico e identificação de parasitos. In: De Carli, G.A. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. São Paulo: Atheneu, p. 663-723.
- De Carli, G.A. (2001). Exame de Outros Espécimes do Trato Intestinal e Sistema Urogenital. In: DeCarli GA. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. São Paulo: Atheneu, p. 165-199.
- De Carli, G.A. & Tasca, T. (2001b). *Trichomonas vaginalis*. In: De Carli, G.A. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. São Paulo: Atheneu, p. 453-467.
- de Jesus, J.B., Podlyska, T.M., Hampshire, A., Lopes, C.S., Vannier-Santos, M.A., Meyer-Fernandes, J.R. (2002). Characterization of an ecto-phosphatase activity in the human parasite *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology Research** 88: 991-997.
- de Souza, W. & Benchimol, M. (1988). Electron spectroscopic imaging of calcium in the hydrogenosomes of *Tritrichomonas foetus*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology** 20: 619-621.
- de Souza, W. (2002). Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitology Research** 88, 1013-1025.
- Di Iorio, P., Kleywegt, S., Ciccarelli, R., Traversa, U., Andrew, C.M., Crocker, C.E., Werstiuk, E.S., Rathbone, M.P. (2002). Mechanisms of apoptosis induced by purine nucleosides in astrocytes. **Glia** 38: 179-190.
- Ding, Y., Cesare, P., Drew, L., Nikitaki, D., Wood, J.N. (2000). ATP, P2X receptors and pain pathways. **Journal of Autonomic Nervous System** 81: 289-294.
- Draper, D., Donohoe, W., Mortimer, L., Heine, R.P. (1998). Cysteine proteases of *Trichomonas vaginalis* degrade secretory leukocyte protease inhibitor. **The Journal of Infectious Diseases** 178: 815-819.
- Drmota, T., Proost, P., Van Ranst, M., Weyda, F., Kulda, J., Tachezy, J. (1996). Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization. **Molecular and Biochemical Parasitology** 83: 221-234.

- Dubouguer, C., Christophe, N., Durand-Joly, I., Gerbod, D., Delgado-Viscogliosi, P., Jouveshomme, S., Leclerc, C., Cartolano, G.-L., Dei-Cas, E., Capron, M., Viscogliosi, E. (2003). Pulmonary coinfection by *Trichomonas vaginalis* and *Pneumocystis* sp. as a novel manifestation of AIDS. **Human Pathology** 34: 508-511.
- Edwards, D.I. (1993). Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 31: 9-20.
- Engbring, J.A., O'Brien, J.L., Alderete, J.F. (1996). *Trichomonas vaginalis* adhesin proteins display molecular mimicry to metabolic enzymes. **Advances in Experimental Medicine and Biology** 408: 207-223.
- Engbring, J. & Alderete, J.F. (1998). Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. **Molecular Microbiology** 28: 305-313.
- Farris, V.K. & Honigberg, B.M. (1970). Behavior and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* Donné in chick liver cell cultures. **Journal of Parasitology** 56: 849-882.
- Faudry, E., Lozzi, S.P., Santana, J.M., D'Souza, Ault, M., Kieffer, S., Felix, C.R., Ricart, C.A., Sousa, M.V., Vernet, T., Teixeira, A.R. (2004). *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. **The Journal of Biological Chemistry** 279: 19607-19613.
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Dal Susino, M., Collo, G., Buell, G., Di Virgilio F. (1997). ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells. **Neuropharmacology** 36: 1295-1301.
- Ferreira, S.T., Vasconcelos, E.G., Verjovski-Almeida, S. (1995). The ecto-ATPases of endoparasites and of blood cells and vessels. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science** 47: 151-166.
- Fietto, J.L., De Marco, R., Nascimento, I.P., Castro, I.M., Carvalho, T.M., de Souza, W., Bahia, M.T., Alves, M.J., Verjovski-Almeida, S. (2004). Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communication** 316: 454-60.
- Fillipini, A., Taffs, R.E., Agui, T., Sitkovsky, M.V. (1990). Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. **Journal of Biological Chemistry** 265: 334-340.
- Garcia, A.F., Chang, T.-H., Benchimol, M., Klumpp, D.J., Lehker, M.W., Alderete, J.F. (2003). Iron and contact with host cells induce expression of adhesions on surface of *Trichomonas vaginalis*. **Molecular Microbiology** 47: 1207-1224.

- Gorrell, T.E. (1985). Effect of culture medium content on the biochemical composition and metabolism of *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Bacteriology** 161: 1228-1230.
- Grostein, F., Goldman, M.B., Cramer, D.W. (1993). Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. **American Journal of Epidemiology** 137: 577-584.
- Handa, M. & Guidotti, G. (1996). Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications** 218: 916-923.
- Harris, D.I., Breechey, R.B., Linstead, D., Barrett, J. (1988). Nucleoside uptake by *Trichomonas vaginalis*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 29: 105-116.
- Haskó, G. & Cronstein, B.N. (2004). Adenosine: and endogenous regulator of innate immunity. **TRENDS in Immunology** 25: 33-39.
- Heyworth, P.G., Gutteridge, W.E., Ginger, C.D. (1982). Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. **FEBS Letters** 141: 106-110.
- Heyworth, P.G., Gutteridge, W. E., Ginger, C.D. (1984). Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. **FEBS Letters** 176: 55-60.
- Hobbs, M.M., Kzembe, P., Reed, A.W., Miller, W.C., Nkata, E., Zimba, D., Daly, C.C., Chakraborty, H., Cohen, M.S., Hoffman, I. (1999). *Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawian men. **Sexually Transmitted Diseases** 26: 381-7.
- Hoffman, D.J., Brown, G.D., Wirth, F.H., Gebert, B.S., Bailey, C.L., Anday, E.K. (2003). Urinary tract infection with *Trichomonas vaginalis* in a premature newborn infant and the development of chronic lung disease. **Journal of Perinatology** 23: 59-61.
- Hogue, M.J. (1943). The effect of *Trichomonas vaginalis* on tissue culture cells. **American Journal of Hygiene** 37: 142-152.
- Holmes, K.K., Handsfield, H.H., Wang, S.P., Wentworth, B.B., Turck, M., Anderson, J.B., Alexander, E.B. (1975). Etiology of nongonococcal urethritis. **New England Journal of Medicine** 292: 1199-1205.
- Honigberg, B.M. (1990). Taxonomy and nomenclature. In: Honigberg, B.M. (Ed.), **Trichomonads parasitic in humans**. Springer-Verlag, New York, pp. 3-4.
- Honigberg, B.M., Brugerolle, G. (1990). Structure. In: Honigberg, B.M. (Ed.), **Trichomonads parasitic in humans**. Springer-Verlag, New York, pp. 5-35.

- Johnson, P., Lathi, J.C., Bradely, J.P. (1993). Biogenesis of the hydrogenosome: an unusual organelle found in the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Parasitology** 79: 664-670.
- Kansas, G.S., Wood, G.S., Tedder, T.F. (1991). Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. **Journal of Immunology** 146: 2235-2244.
- Kassai, T., Cordero del Campillo, M., Euzeby, J., Gaafar, S., Hiepe, T., Himonas, C.A. (1988). Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD). **Veterinary Parasitology** 29: 299-326.
- Kegel, B., Braun, N., Heine, P., Maliszewski, C.R. and Zimmermann, H. (1997). An Ecto-ATPase and an Ecto-ATP Diphosphohydrolase are Expressed in Rat Brain. **Neuropharmacology** 36: 1189-1200.
- Kirley, T.L. (1997). Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase – homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. **The Journal of Biological Chemistry** 272: 1076-1081.
- Knowles, A.F., Nagy, A.K., Strobel, R.S., Wu-Weis, M. (2002). Purification, characterization, cloning, and expression of the chicken liver ecto-ATP-diphosphohydrolase. **European Journal of Biochemistry** 269: 2373-2382.
- Kotcher, E. & Hoogasian, A.C. (1957). Cultivation of *Trichomonas vaginalis* Donné, 1837, in association with tissue cultures. **Journal of Parasitology** 43: 39.
- Kott, H. & Alder, S. (1961). A serological study of *Trichomonas vaginalis* sp. parasitic in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 55, 333-344.
- Krieger, J.N., Poisson, M.A., Rein, M.F. (1983). Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. **Infection and Immunity** 41: 1291-1295.
- Krieger, J.N. (1984). Prostatitis syndromes: pathophysiology, differential diagnosis, and treatment. **Sexually Transmitted Diseases** 11: 100-112.
- Krieger, J.N., Holmes, K.K., Spence, M.R., Rein, M.F., McCormack, W.M., Tam, M.R. (1985). Geographic variation among isolates of *Trichomonas vaginalis*: demonstration of antigenic heterogeneity by using monoclonal antibodies and indirect immunofluorescence technique. **Journal of Infectious Diseases** 152: 979-984.

- Krieger, J.N. (1990). Epidemiology and clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in men. In: Honigberg, B.M. (Ed.), **Trichomonads parasitic in humans**. Springer-Verlag, New York, pp. 235-245.
- Krieger, J.N., Jenny, C., Verdon, M., Siegel, N., Springwater, R., Critchlow, C.W., Holmes, K. K. (1993). Clinical manifestations of trichomoniasis in men. **Annals of International Medicine** 118: 844-849.
- Kukulski, F. & Komoszynski, M. (2003). Purification and characterization of NTPDase1 (ecto-apyrase) and NTPDase2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes. **European Journal of Biochemistry** 270: 3447-3454.
- Kulda, J. (1967). Effect of different species of trichomonads on monkey kidney cell cultures. **Folia Parasitologica** 14: 295-310.
- Kulda, J. (1999). Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. **International Journal for Parasitology** 29: 199-212.
- Laga, M., Manoka, A., Kivuvu, M., Malele, B., Tulza, M., Nzila, N., Goeman, J., Behets, F., Batter, V., Alary, M., Heyward, W. L., Ryder, R. W., Piot, P. (1993). Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: Results from a cohort study. **AIDS** 7: 95-102.
- Langston, H.P., Ke, Y., Gewirtz, A.T., Dombrowski, K.E., Kapp J.A. (2003). Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **Journal of Immunology** 170: 2962-2970.
- LeBel, D., Poirier, G.G., Phaneuf, S., St-Jean, P., Laliberte, J.F., Beaudoin, A.R. (1980). Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. **The Journal of Biological Chemistry** 255: 1227-1233.
- Lehker, M.W., Chang, T-H., Dailey, D.C, Alderete, J.F. (1990). Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Experimental Medicine** 171: 2165-2170.
- Lehker, M.W., Arroyo, R., Alderete, J.F. (1991). The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Experimental Medicine** 174: 311-318.
- Lehker, M.W. & Alderete, J.F. (1992). Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonal proteins. **Molecular Microbiology** 6: 123-132.
- Lehker, M.W. & Alderete, J.F. (2000). Biology of trichomonosis. **Current Opinion in Infectious Diseases** 13: 37-45.

- Lemmens, R., Kupers, L., Sévigny, J., Beaudoin, A.R., Grondin, G., Kittel, A., Waelkens, E., Vanduffel, L. (2000). Purification, characterization, and localization of an ATP diphosphohydrolase in porcine kidney. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**. 278: F978-988.
- Linstead, D. (1990). Cultivation. In: Honigberg, B.M. (Ed.), **Trichomonads parasitic in humans**. Springer-Verlag, New York, pp. 91-111.
- Maliszewski, C. R., Delespesse, G. J., Schoenborn, M. A., Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Nakajima, T., Baker, E., Sutherland, G.R., Poindexter, K., Birks, C., Alpert, A., Friend, D., Gimpel, S.D., Gayle III, R.B. (1994). The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. **Journal of Immunology** 153: 3574-3583.
- Marcus, A.J., Broekman, M.J., Drosopoulos, J.H.F., Islam, N. Alyonycheva, T.N., Safier, L.B., Hajjar, K.A., Posnett, D.N., Schoenborn, M.A., Schooley, K.A., Gayle, R.B., Maliszewski, C.R. (1997). The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. **Journal of Clinical Investigation** 99: 1351-1360.
- Matos, J.A.A., Borges, F.P., Tasca, T., Bogo, M.R., De Carli, G.A., Fauth, M.G., Dias, R.D., Bonan, C.D. (2001). Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. **International Journal for Parasitology** 31: 770-775.
- Menz, G.L. & Mégraud. F. (2002). Is the molecular basis of metronidazole resistance in microaerophilic organisms understood? **Trends in Microbiology** 10: 370-375.
- Mertens, E., Van Schaffingen, E., Muller, M. (1992). Pyruvate kinase from *Trichomonas vaginalis* an allosteric enzyme stimulated by ribose 5-phosphate and glycerate-3-phosphate. **Molecular and Biochemical Parasitology** 54: 13-20.
- Meyer-Fernandes, J.R., Dutra, P.M.L., Rodrigues, C.O., Saad-Nehme, J., Lopes, A.H.C.S. (1997). Mg-Dependent Ecto-ATPase Activity in *Leishmania tropica*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 341: 40-46.
- Michaelis, R.M. & Treick, R.W. (1962). The mode of action of certain 3- and 5-nitropyridines and pyrimidines. III. Biochemical lesions in *Trichomonas vaginalis*. **Experimental Parasitology** 12: 401-417.
- Miller, R.L. & Linstead, D. (1983). Purine and pyrimidine metabolizing activities in *Trichomonas vaginalis* extracts. **Molecular and Biochemical Parasitology** 7: 41-51.

- Müller, M. (1990). Biochemistry of *Trichomonas vaginalis*. In: Honigberg, B.M. (Ed.), **Trichomonads parasitic in humans**. Springer-Verlag, New York, pp. 53-83.
- Müller, M. (1993). The hydrogenosome. **Journal of General Microbiology** 139: 2879-2889.
- Munagala, N. R. & Wang, C. C. (2003). Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 127: 143-149.
- Nielsen, M.H. (1974). Fine structural localization of nucleoside triphosphatase and acid phosphatase activity in *Trichomonas vaginalis* Donné. **Cell Tissue Research** 151: 269-280.
- Ngô, H.M., Ngô, E.O., Bzik, D.J., Joiner, K.A. (2000). *Toxoplasma gondii*: are host cell adenosine nucleotides a direct source for purine salvage? **Experimental Parasitology** 95: 148-153.
- O'Brien, J.L., Lauriano, C.M., Alderete, J.F. (1996). Molecular characterization of a third malic enzyme-like AP65 adhesin gene for *Trichomonas vaginalis*. **Microbial Pathogenesis** 20: 335-349.
- Oliveira, E.M., Battastini, A.M.O., Meirelles, M.N.L., Moreira, C.M., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F. (1997). Characterization and localization of a ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) in sarcolemmal membrane from rat heart. **Molecular and Cellular Biochemistry** 170: 115-123.
- Peterson, K.M. & Alderete, J.F. (1982). Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. **Infection and Immunity** 37: 755-762.
- Peterson, K.M. & Alderete, J.F. (1984). *Trichomonas vaginalis* is dependent on uptake and degradation of human low density lipoproteins. **Journal of Experimental Medicine** 160: 1261-1272.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., Garber, G. (1998). Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews** 11, 300-317.
- Plesner, L. (1995). Ecto-ATPases: Identities and functions. **International Review of Cytology** 158: 141-214.
- Provenzano, D. & Alderete, J.F. (1995). Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. **Infection and Immunity** 63: 3388-3395.
- Ralevic, V. & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacology Reviews** 50: 413-492.

- Read, C.P. (1957). Comparative studies on the physiology of trichomonad protozoa. **Journal of Parasitology** 43: 385-394.
- Rein, M.F. (1990). Clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in women. In: Honigberg, B.M. (Ed.), **Trichomonads parasitic in humans**. Springer-Verlag, New York, pp. 225-234.
- Rein, M.F. (1995). *Trichomonas vaginalis*. In: Mandell, Douglas, Bennet. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. New York: Churchill Livingstone, p. 2493-2497.
- Rendón-Maldonado, J.G., Espinosa-Cantellano, G.R.A., Martínez-Palomo, A. (1998). *Trichomonas vaginalis*: *In vitro* phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leucocytes, and erythrocytes. **Experimental Parasitology** 89: 241-250.
- Resta, R., Hooker, S.W., Hansen, K.R., Laurent, A.B., Park, J.L., Blackburn, M.R., Knudsen, T.B., Thompson, L.F. (1993). Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73): cDNA cloning and tissue distribution. **Gene** 133: 171-177.
- Sarkis, J.J.F., Battastini, A.M.O., Oliveira, E.M., Frassetto, S.S., Dias, R.D. (1995). ATP diphosphohydrolases: An overview. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science** 47, 131-136.
- Sévigny, J., Levesque, F.P., Grondin, G., Beaudoin, A.R. (1997a). Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques. **Biochimica et Biophysica Acta** 1334: 73-88.
- Sévigny, J., Picher, M., Grondin, G., Beaudoin, A.R. (1997b). Purification and immunohistochemical localization of the ATP diphosphohydrolase in bovine lungs. **American Journal of Physiology** 272: L939-950.
- Shah, P.H., Stiles, J.K., Finley, R.W., Lushbaugh, W.B., Meade, J.C. (2002). *Trichomonas vaginalis*: characterization of a family of P-type ATPase genes. **Parasitology International** 51: 41-51.
- Sharma, N.N. & Bourne, G.H. (1967). Distribution of adenosine triphosphatase in *Trichomonas vaginalis*. **Acta Histochemistry** 26: 210-221.
- Shi, J.-D., Kukar, T., Wang, C.-Y., Li, Q.-Z., Cruz, P.E., Davoodi-Semiromi, A., Yang, P., Yunrong, G., Lian, W., Wu, D.H., She, J.X. (2001). Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). **The Journal of Biological Chemistry** 276: 17474-17478.

- Sitkovsky, M.V. (1998). Extracellular purines and their receptors in immunoregulation. Review of recent advances. **Nippon Ika Daigaku Zasshi** 65: 351-357.
- Smith, T.M., Kirley, T.L., Hennessey, T.M. (1997). A soluble ecto-ATPase from *Tetrahymena thermophila*: purification and similarity to the membrane-bound ecto-ATPase of smooth muscle. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 337: 351-359.
- Smith, T.M., Kirley, T.L. (1998). Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. **Biochimica and Biophysics Acta** 1386: 65-78.
- Sneddon, P., Westfall, T.D., Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S., Westfall, D.P., Kennedy, C. (1999). Modulation of purinergic neurotransmission. **Progress in Brain Research** 120: 11-20.
- Sorvillo, F. & Kerndt, P. (1998). *Trichomonas vaginalis* and amplification of HIV-1 transmission. **Lancet** 351: 213-4.
- Sorvillo, F., Smith, L., Kerndt, P., Ash, L. (2001). *Trichomonas vaginalis*, HIV, and Africans. **Emergent Infectious Disease** 7: 927-932.
- Steinberg, T.H. & Di Virgilio, F. (1991). Cell-mediated cytotoxicity: ATP as an effector and the role of target cells. **Current Opinion in Immunology** 3: 71-75.
- Steinbuchel, A. & Müller, M. (1989). Anaerobic pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology** 20: 57-65.
- Tasca, T., Bonan, C.D., De Carli, G.A., Battastini, A.M., Sarkis, J.J. (2003a). Characterization of an ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) activity from intact cells of *Trichomonas vaginalis*. **Experimental Parasitology** 105: 167-173.
- Tasca, T., Borges, F.P, Bonan, C.D., De Carli, G.A., Battastini, A.M., Sarkis, J.J. (2003b). Effects of metronidazole and tinidazole on NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase from intact cells of *Trichomonas vaginalis*. **FEMS Microbiology Letters** 226: 379-384.
- Tasca, T., Bonan, C.D., De Carli, G.A., Sarkis, J.J. (2004). *Trichomonas vaginalis*: cytochemical localization of a NTPDase1 and an ecto-5'-nucleotidase and effects of adenine nucleotides on cellular viability. **Parasitology Research** 93: 300-3.

- Torian, B.E., Connelly, R.J., Stephens, R.S., Stibbs, H.H., (1984). Specific and common antigens of *Trichomonas vaginalis* detected by monoclonal antibodies. **Infection and Immunity** 43: 270-275.
- Tracy, J.W. & Webster, L.T. (1996). Drugs Used in the Chemoterapy of Protozoal Infections. In: Goodman and Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York: McGraw-Hill Companies, p. 995-998.
- Turner, A.C. & Lushbaugh, W.B. (1991). Three aspecific ATPases in *Trichomonas vaginalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology B** 100: 691-696.
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Galperin, M.Y., Ribeiro, J.M. (1998). Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*. A new type of nucleotide-binding enzyme. **The Journal of Biological Chemistry** 273: 30583-30590.
- Vara, F. & Serrano, R. (1981). Purification and characterization of a membrane-bound ATP diphosphohydrolase from *Cicer arietinum* (chick-pea) roots. **Biochemistry Journal** 197: 637-643.
- Vasconcelos, E.G., Nascimento, P.S., Meirelles, M.N.L., Verjovski-Alemida, S., Ferreira, S.T. (1993). Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase on the external surface of tegument of *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 58: 205-214.
- Vasconcelos, E.G., Ferreira, S.T., Carvalho, T.M.U., De Souza, W., Kettlun, A.M., Mancilla, M., Valenzuela, M.A., Verjovski-Almeida, S. (1996). Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Biological Chemistry** 36: 22139-22145.
- Viikki, M., Pukkala, E., Nieminen, P. & Hakama, M. (2000). Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. **Acta Oncologica** 39: 71-75.
- Wang, C.C. & Cheng, H.-H. (1984). Salvage of pyrimidine nucleosides by *Trichomonas vaginalis*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 10: 171-184.
- Wang, A.L., Wang, C.C., Alderete, J.F. (1987). *Trichomonas vaginalis* phenotypic variation occurs only among trichomonads with double-stranded RNA virus. **Journal of Experimental Medicine** 166: 142-150.
- Wang, C.C. (1990). Nucleic acid metabolism in *Trichomonas vaginalis*. In: Honigberg, B.M. (Ed.), **Trichomonads parasitic in humans**. Springer-Verlag, New York, pp. 84-90.

- Wang, T.F. & Guidotti, G. (1996). CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-apyrase. **The Journal of Biological Chemistry** 271: 9898-9901.
- Wang, T.F. & Guidotti, G. (1998). Golgi localization and functional expression of human udirine diphosphatase. **The Journal of Biological Chemistry** 273: 11392-11399.
- Weinstock, H., Berman, S., Cates, W.Jr. (2004). Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. **Perspectives in Sexually Reproductive Health** 36: 6-10.
- Zhang, Z.F., Begg, C.B. (1994). Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. **International Journal of Epidemiology** 23: 682-90.
- Zimmermann, H. (1992). 5'-Nucleotidase: molecular structure e functional aspects. **Biochemical Journal** 285: 345-365.
- Zimmermann, H. (1996). Extracellular Purine Metabolism. **Drug Development Research** 39: 337-352.
- Zimmermann, H. (1999). Two novel families of ecto-nucleotidases: molecular structures, catalytic properties, and a search for function. **Trends in Pharmacological Sciences** 20: 231-236.
- Zimmermann, H. (2001). Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. **Drug Development Research** 52: 44-56.

I.V. ANEXOS

ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DE VIGÊNCIA DO DOUTORADO

- Matos, J.A.A., Borges, F.P., Tasca, T., Bogo, M.R., De Carli, G.A., Fauth, M.G., Dias, R.D., Bonan, C.D. (2001). Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. **International Journal for Parasitology** 31 (8): 770-775.
- Tasca, T., De Carli, G.A., Glock, L., Jeckel-Neto, E.A., Indrusiak, C. (2001). Prevalence of *Tetratrichomonas didelphidis* from the intestine of the opossum *Didelphis albiventris* in the Botanical Garden, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. **Parasitologia al Dia** 25 (3-4): 132-134.
- Tasca, T., De Carli, G.A., Glock, L., Jeckel-Neto, E.A. (2001). Morphologic aspects of *Tetratrichomonas didelphidis* isolated from the opossums *Didelphis marsupialis* and *Lutreolina crassicaudata*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 96 (2): 265-271.
- Tasca, T., De Carli, G.A. (2001). Growth kinetic study of *Tetratrichomonas didelphidis* isolated from opossum *Lutreolina crassicaudata* and interaction with a prokaryotic cell. **Parasitology Research** 87 (8): 626-630.
- Rosset, I., Tasca, T., Tessele, P., De Carli, G.A. (2002). Scanning electron microscopy on the investigation of in vitro hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology Research** 88: 356-359.
- Lecke, S.B., Tasca, T., Souto, A.A., De Carli, G.A. (2002). *Trichomonas vaginalis*: microtubule cytoskeleton distribution using fluorescent taxoid. **Experimental Parasitology** 102: 113-116.
- De Carli, G.A., Tasca, T. (2002). *Trichomonas gallinae*: a possible contact-dependent mechanism in the hemolytic activity. **Veterinary Parasitology** 87: 111-118.
- Tasca, T., De Carli, G.A. (2002). Shape variation of *Trichomonas vaginalis* in presence of different substrates. **Parasitologia Lationamericana** 57: 5-8.
- Lecke, S.B., Tasca, T., Souto, A.A., De Carli, G.A. (2003). Perspective of a new diagnostic for human trichomonosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 98: 273-276.
- Tasca, T., De Carli, G.A. (2003). Scanning electron microscopy study of *Trichomonas gallinae*. **Veterinary Parasitology** 118: 37-42.

- Lecke, S.B., Tasca, T., Souto, A.A., De Carli, G.A. (2003). Microtubule cytoskeleton distribution using fluorescent taxoid in *Tetratrichomonas didelphidis*. **Parasitologia Latinoamericana** 58: 101-105.
- Tasca, T., De Carli, G.A. (2003). Electron microscopy study of *Tetratrichomonas didelphidis* and its interaction with a prokaryotic cell. **Parasitology Research** 92: 106-109.
- Maciel, G.P., Tasca, T., De Carli, G.A. (2004). Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 40 (3): 152-160.
- De Carli, G.A., Tasca, T., Borges, F.P. (2004). *Tritrichomonas foetus*: a scanning electron microscopy study of erythrocyte adhesion associated with hemolytic activity. **Veterinary Research** 35: 123-130.
- Borges, F.P., Wiltuschnig, R.C.M., Tasca, T., De Carli, G.A. (2004). Scanning electron microscopy study of *Tritrichomonas augusta*. **Parasitology Research** 94: 158-161.

CAPÍTULOS DE LIVRO PUBLICADOS NO PERÍODO DE VIGÊNCIA DO DOUTORADO

- De Carli, G.A. & Tasca, T. (2001). *Trichomonas vaginalis*. In: De Carli, G. A. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. Rio de Janeiro: Atheneu. p. 453-472.
- De Carli, G.A. & Tasca, T. (2001). *Trichomonas tenax* e *Trichomonas hominis*. In: De Carli, G. A. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. Rio de Janeiro: Atheneu. p. 473-479.
- Tasca, T. & de Almeida, S. (2001). Manutenção e Controle de Qualidade de equipamentos. In: De Carli, G. A. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. Rio de Janeiro: Atheneu. p. 611-621.
- De Carli, G.A. & Tasca, T. (2001). Filarioses. In: De Carli, G. A. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. Rio de Janeiro: Atheneu. p. 355-371.
- De Carli, G.A. & Tasca, T. (2001). Diagnóstico e Identificação de Parasitos. In: De Carli, G. A. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. Rio de Janeiro: Atheneu. p. 663-723.

- De Carli, G.A., Tasca, T., Machado, A.R.L. (2004). Parasitoses Intestinais. In: Duncan, B.B., Schmidt, M.I., Giugliani, E.R.J. (Org.). **Medicina Ambulatorial: Condutas de Atenção Primária Baseadas em Evidências**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed. p. 1465-1475.
- De Carli, G.A., Vaz, A.J., Tasca, T. (2004). Outras parasitoses teciduais: cisticercose e hidatiose. In: Duncan, B.B., Schmidt, M.I., Giugliani, E.R.J. (Org.). **Medicina Ambulatorial: Condutas de Atenção Primária Baseadas em Evidências**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed. p. 1488-1493.