

Interação de *Trichomonas vaginalis* com IEC-6 ativadas com interferon-gamma: exposição de fosfatidilserina e evasão contra a ação microbicida de óxido nítrico

Amanda Nogueira Galvão Hemerly

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF
Centro de Biociências e Biotecnologia
Campos dos Goytacazes - RJ

Julho de 2016

Interação de *Trichomonas vaginalis* com IEC-6 ativadas com interferon-gamma: exposição de fosfatidilserina e evasão contra a ação microbicida de óxido nítrico.

Amanda Nogueira Galvão Hemerly

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia sob a orientação do Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra.

Aprovada em 18 de julho de 2016:

Prof. Dr. Fábio Lopes Olivares (Doutor em Agronomia - Ciências do Solo) UENF

Prof. Dr. Jorge Hudson Petretski (Doutor em Biociências e Biotecnologia) UENF

Prof^a. Dr^a. Jessica Manyá Bittencourt Dias Vieira (Ciências - Microbiologia) UEZO

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta (Doutor em Ciências) UENF (Coorientador)

Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra (Doutor em Ciências) UEZO (Orientador)

Dedico esta dissertação à Deus e aos meus pais.

Agradecimentos

À Deus, por minha vida e de todos que amo e pela força para continuar.
Aos meus pais e meus avós. Vocês merecem toda minha retribuição e amor.

Vou amar e cuidar de vocês para vida inteira. Obrigada por tudo.

Aos meus irmãos, Guilherme, Nina, Saramago e Fonseca. Obrigada por sumirem com as dificuldades com gestos simples e me fazerem sentir muito amada por vocês. Vocês são luz.

Aos meus tios paternos, por tanta felicidade e por acreditarem em mim.

À Emanuele e Eliel por terem voltado para onde nunca deveriam ter partido.

À Monique, minha razão quando não consigo sozinha, pelas quase duas décadas e pelo felicidade de ser sua melhor amiga.

À Lorrana e Tauana por esta amizade, amor e felicidade, para a vida inteira. Já viramos família e sororidade. Descrever a importância que vocês tem na minha vida e as pessoas maravilhosas que vocês são, é além da minha capacidade.

À Ivson, que amo, me orgulho e cuido e à Mayla, pela amizade existente mesmo que à distância.

À Nicolli e Victor, por todos os planos que fazemos juntos e pela alegria que trazem para mim.

Aos amigos Pedro, Nayara, Julia e Juliana Azevedo por todo a ajuda e amparo emocional que precisei.

Ao Rogério, pelo reconforto, refúgio e ânimo nas horas difíceis e por me encher de lembranças felizes.

À Luisa, minha irmã, meu ponto fixo e meu equilíbrio. Com certeza não teria conseguido sem você e sou grata demais por esta amizade inesperada e instantânea. Obrigada por tudo, amo você e vamos juntas.

À Thamyres, Thiago, Yago, Felipe, Pedro Theófilo e toda a equipe do LTBM pelo auxílio laboratorial e companheirismo.

Aos membros do LBCT, por toda receptividade e auxílio sempre que precisei.

Ao meu orientador Sergio Henrique Seabra e co-orientador Renato Augusto DaMatta pela oportunidade, apoio imensurável e por todo incentivo.

Resumo

Tricomoniase é a doença sexualmente transmissível não-viral mais comum atualmente no mundo, superando índices de síndrome da imunodeficiência adquirida, entre outras. Essa doença é causada por *Trichomonas vaginalis*, parasito extracelular do trato urogenital humano. Apesar de vários estudos, pouco se sabe sobre a interação deste parasito com células hospedeiras. Com isto, é necessário entender o mecanismo de infecção de *T. vaginalis*. Fosfatidilserina (PS) é um fosfolípido localizado na face interna da membrana plasmática em células normais. A exposição de PS para a face externa da membrana sinaliza morte celular programada por apoptose. No entanto, alguns protozoários como *Leishmania amazonensis*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium chabaudi* e *Trypanosoma cruzi* expõem PS, levando à desativação de macrófagos, degradação da enzima óxido nítrico sintase induzida e consequente redução da produção de óxido nítrico (NO), persistindo nestas células hospedeiras. IEC-6 é uma linhagem de célula epitelial intestinal que produz NO sendo ótimo modelo *in vitro*. Nós observamos que 37% da população total de trofozoítos de *T. vaginalis* expõem PS. A população total de *T. vaginalis* sem e com bloqueio da PS (por incubação com anexina V) interagiu com IEC-6 ativada por INF- γ e verificou-se que os níveis de NO produzidos por IECs-6 foram menores quando não houve bloqueio da PS e similares ao controle quando houve bloqueio. A população total de *T. vaginalis* foi separada em subpopulações PS+ e PS- e os níveis de NO foram analisados após interação com IEC-6. Constatou-se que a subpopulação PS+ reduziu a produção de NO, enquanto na subpopulação PS- não ocorreu o mesmo. Ademais, a interação entre IEC-6 e a população total de *T. vaginalis* reduziu a expressão da enzima NO sintase induzida. A microscopia eletrônica de varredura revelou íntimo contato de trofozoítos com IEC-6. Estes resultados indicam que a exposição de PS por parte da população de *T. vaginalis* é responsável pela redução da produção de NO de IEC-6, sendo este um recurso para evasão da resposta imune do hospedeiro, garantindo a persistência da infecção. Estes resultados mostram a relação entre *T. vaginalis* e outro tipo de célula epitelial além da vaginal, ambos os tipos capazes de gerar resposta imune após ativadas.

Palavras chaves: *Trichomonas vaginalis*, fosfatidilserina, óxido nítrico, IEC-6

Abstract

Trichomoniasis is the non-viral sexually transmitted disease most common in the world nowadays, overcoming indexes of acquired immunodeficiency syndrome, among others. This disease is caused by *Trichomonas vaginalis*, an extracellular parasite of the human urogenital tract. Although several studies have been done, little is known about the interaction of this parasite with host cells. Thus, it is required to understand the *T. vaginalis* infection mechanism. Phosphatidylserine (PS) is a phospholipid located on the inner face of the plasma membrane in normal cells. PS exposure on the external face of the membrane indicates programmed cell death by apoptosis. However, some protozoa such as *Leishmania amazonensis*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* and *Plasmodium chabaudi* expose PS, leading to macrophage deactivation, degradation of inducible nitric oxide synthase enzyme and consequent reduction of nitric oxide (NO) production and persistence in these host cells. IEC-6 is a intestinal epithelial cell lineage capable of producing NO, thus being a excellent *in vitro* model. Here was characterized that 37% of the total population of *T. vaginalis* trophozoites exposes PS. The total population of *T. vaginalis* without and with PS blockage (by incubation with Annexin V) interacted with INF- γ activated IEC-6 and it was found that the levels of NO produced by IEC-6 were lower when there was no PS blockage and similar to the control when there was blockage. The total population of *T. vaginalis* was separated into PS+ and PS- subpopulations and NO levels were analyzed after interaction with IEC-6. It was found that PS+ subpopulation reduced NO production while the same did not occur with the PS- subpopulation. Furthermore, the interaction between IEC-6 and the total population of *T. vaginalis* reduced the expression of the induced NO synthase enzyme. Scanning electron microscopy revealed intimate contact of trophozoites with IEC-6. These results indicate that PS exposure by part of the *T. vaginalis* population is responsible for the reduction of NO production of IEC-6, this being a feature for the evasion of the host immune response, ensuring the persistence of the infection. These results show the relation between *T. vaginalis* and another type of epithelial cell besides the vaginal one, both types capable of generate imune response after activated.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, phosphatidylserine, nitric oxide, IEC -6

Lista de Figuras

Figura 1 - Hidrogenossomos em <i>Trichomonas vaginalis</i>	17
Figura 2 - Exposição de fosfatidilserina em trofozoítos de <i>Trichomonas vaginalis</i>	32
Figura 3 – Quantificação de nitrito por IEC-6 ativadas após interação com <i>Trichomonas vaginalis</i>	34
Figura 4 - Quantificação de nitrito por IEC-6 ativadas após interação com subpopulação PS de trofozoítos de <i>Trichomonas vaginalis</i>	35
Figura 5 - Expressão de oxido nítrico sintase induzida e filamentos de actina em IEC-6 ativadas.....	36
Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura da interação de <i>Trichomonas vaginalis</i> com IEC-6 ativadas.	37

Lista de abreviatura e siglas

- BSA: albumina sérica bovina
DMEM: meio de Eagle modificado de Dulbecco
IEC-6: células da linhagem epitelial intestinal
IFN- γ : interferon gamma
iNOS: óxido nítrico sintase induzida
LCD: Leishmaniose cutânea difusa
LCL: Leishmaniose cutânea localizada
LPS: lipopolissacarídeo
NO: óxido nítrico
PS: fosfatidilserina
SFB: soro fetal bovino
TGF- β 1: fator de crescimento de transformação beta1
VECs: células epiteliais vaginais

Sumário

1. Introdução	11
2. Revisão de Literatura.....	13
2.1. Tricomoníase.....	13
2.2. <i>Trichomonas vaginalis</i>	14
2.3. Epitélio vaginal	19
2.4. Célula Epitelial Intestinal	20
2.5. Mimetismo Apoptótico.....	22
3 Objetivos	28
3.1. Objetivos gerais	28
3.2. Objetivos específicos	28
4. Materiais e métodos	29
4.1. Cultivo de trofozoítos de <i>T. vaginalis</i>	29
4.2. Análise da exposição de PS por <i>T. vaginalis</i>	29
4.3. Isolamento de subpopulações PS+ e PS-	29
4.4. Cultivo de IEC-6	30
4.5. Ativação de IEC-6 e interação com <i>T. vaginalis</i>	30
4.6. Teste de viabilidade das IEC-6 após interação com <i>T. vaginalis</i>	30
4.7. Análise da produção de óxido nítrico	31
4.8. Imunofluorescência	31
4.9. Microscopia Eletrônica de Varredura	31
5. Resultados	33
5.1. Uma subpopulação de trofozoítos de <i>T. vaginalis</i> expõe PS	33
5.2. Viabilidade das IEC-6 não alterou após interação com <i>T. vaginalis</i>	34
5.3. <i>Trichomonas vaginalis</i> inibe produção de NO de IEC-6 via exposição de PS	34

5.4. Interação de IEC-6 ativadas com <i>T. vaginalis</i> reduziu a expressão de iNOS, mas não alterou filamentos de actina	36
5.5. Análise ultraestrutural da interação de <i>T. vaginalis</i> com células IEC-6 ativadas	38
6. Discussão.....	39
7. Conclusões	43
8. Referências bibliográficas	44

1. Introdução

Trichomonas vaginalis é um protozoário flagelado, parasito extracelular obrigatório do trato urogenital humano (Schwebke & Burgess, 2004). Este parasito é o agente etiológico da Tricomoniase, doença sexualmente transmissível, com uma estimativa de aproximadamente 276.400 milhões de novos casos por ano, considerada atualmente a infecção sexualmente transmissível mais comum, superando os índices de gonorreia e sífilis (OMS, 2012).

Apesar de vários estudos, pouco se conhece sobre os fatores que conduzem aos quadros graves de infecção da tricomoníase, podendo levar, em mulheres: à infertilidade (Grodstein *et al.*, 1993; El-Shazly *et al.*, 2001), aumento no risco de aquisição de vírus da imunodeficiência humana (Sorvillo & Kerndt, 1998; Sorvillo *et al.*, 1998; McClelland *et al.*, 2007) e estar associado ao câncer cervical (Yap *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Sayed El-Ahl *et al.*, 2002). Em homens a infecção está associada ao aumento no risco de câncer de próstata (Sutcliffe *et al.*, 2006; Stark *et al.*, 2009). Portanto, estudos dos mecanismos de evasão da infecção deste parasito e interações entre a população de *T. vaginalis* e células hospedeiras são necessários.

O mimetismo apoptótico (Barcinski *et al.*, 2003) é um conceito que define um mecanismo de evasão no qual parasitos mimetizam o fenótipo de célula apoptótica expondo fosfatidilserina (PS) na face externa da membrana plasmática e induzindo resposta anti-inflamatória após contato com células hospedeiras. PS é um fosfolípideo localizado na face interna da membrana plasmática e que quando exposto na face externa da membrana sinaliza apoptose, um tipo de morte celular programada (Fadok *et al.*, 1992; Verhoven *et al.*, 1995). Estudos mostram este mecanismo sendo utilizado por protozoários, como *Leishmania (L) amazonensis* (Balanco *et al.*, 2001; França-Costa *et al.*, 2012), *Toxoplasma gondii* (Seabra *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2011) e *Trypanosoma cruzi* (DaMatta *et al.*, 2007) como forma de escape de células efetoras produtoras de óxido nítrico (NO).

Estudos prévios, mostraram que a exposição de PS por *T. gondii* induz a secreção de fator de crescimento de transformação beta1 (TGF- β 1) por macrófagos infectados ativados por interferon gamma (IFN- γ), levando a degradação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Seabra *et al.*,

2004) pela via do proteossomo (Padrão *et al.*, 2014), inibição da produção de NO e consequente persistência da infecção nestas células (Seabra *et al.*, 2004). Neste trabalho analisamos se trofozoítos de *T. vaginalis* usam a exposição de PS quando interagem com células da linhagem epitelial intestinal (IEC-6) ativadas por IFN- γ .

2. Revisão de Literatura

2.1. Tricomoníase

Tricomoníase, protozoose causada pelo parasito *T. vaginalis*, é a doença sexualmente transmissível não-viral mais comum, afetando cerca de 276.400 milhões aproximadamente por ano mundialmente (OMS, 2012). Em humanos, o principal meio de transmissão deste parasito é através de relação sexual sem uso de preservativo. Existem também registros de casos de recém-nascidos de mães infectadas que adquiriram a doença (Al-Salihi *et al.*, 1974).

A tricomoníase apresenta ampla diversidade de manifestações clínicas, desde casos assintomáticos até vaginite severa, que variam de acordo com as condições individuais, número de parasitos infectantes e infectividade das cepas (Maciel *et al.*, 2004). A infecção por este parasito pode levar à infertilidade (Grodstein *et al.*, 1993; El-Shazly *et al.*, 2001), parto prematuro e baixo peso de recém-nascidos de mães infectadas (Cotch *et al.*, 1997). Esta infecção causa predisposição para transmissão do vírus da imunodeficiência humana em pacientes do sexo feminino (Sorvillo & Kerndt, 1998; Sorvillo *et al.*, 1998; McClelland *et al.*, 2007), e possui associação com o desenvolvimento de câncer cervical (Yap *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Sayed El-Ahl *et al.*, 2002). Além disso, são relatados outros sintomas como cervicite, vulvite e vaginite (em mulheres) e uretrite, prostatite e prurido (em homens) (Dunne *et al.*, 2003).

O padrão-ouro para o diagnóstico de infecção por *T. vaginalis* é a observação microscópica (Kissinger., 2015). Atualmente, os fármacos de escolha para tratamento de infecção causada por *T. vaginalis* são tinidazol e metronidazol (Anjaeyulu *et al.*, 1977). Versões em cremes e pessários não são recomendadas devido à baixa taxa de cura comparados ao metronidazol oral, além de aumentar o número de *T. vaginalis* metronidazol-resistentes (Cudmore *et al.*, 2004). Além disto, são recomendadas medidas profiláticas como o uso de preservativo durante o ato sexual (Maciel *et al.*, 2004). Tratamento com metronidazol também é recomendado para casos de gestantes e recém-nascidos com doses específicas (Cudmore *et al.*, 2004).

2.2. *Trichomonas vaginalis*

2.2.1. Taxonomia

Descoberto em 1836 pelo francês Alfred François Donné (Maciel *et al.*, 2004), este parasito pertence ao Filo Zoomastigina, Classe Parabasalia, Ordem Trichomonadida, Família Trichomonadidae, Gênero *Trichomonas*, Espécie *Trichomonas vaginalis* (Schwebke & Burgess, 2004).

2.2.2. Morfologia

T. vaginalis em cultura axênica possui formato uniforme e oval com média de 10 µm de comprimento e 7 µm de largura (Petrin *et al.*, 1998). No entanto, quando adere as células epiteliais vaginais (VECs) o parasito apresenta forma ameboide (Nielsen & Nielsen, 1975). Além disto, esta alteração morfológica é dependente do tipo de célula hospedeira que *T. vaginalis* interage (Arroyo *et al.*, 1993). A transformação de *T. vaginalis* para forma amebóide ocorre logo em seguida à adesão e confere uma relação de profunda intimidade entre parasito e célula hospedeira, com surgimento de pseudópodes do parasito. A partir do momento em que o primeiro protozoário adere à VECs, protozoários adjacentes começam a colonizar esta mesma célula. Outro fator, conseqüente à adesão de *T. vaginalis* à célula hospedeira, é o aumento na produção de certas adesinas pelo parasito possibilitando maior citoaderência. Todos estes eventos demonstram a grande capacidade de influência de *T. vaginalis* sobre sua célula hospedeira e como o processo de adesão é peculiar e extremamente importante na infecção (Arroyo *et al.*, 1993).

Na forma livre, o parasito apresenta forma elipsoidal. Nesta forma o parasito apresenta quatro flagelos, localizados na porção anterior e um quinto flagelo que é incorporado à membrana ondulante do parasito e suportado por uma costa delgada não contrátil, este último flagelo e a membrana ondulante dão a este protozoário motilidade característica (Petrin *et al.*, 1998; Maciel *et al.*, 2004; Schwebke & Burgess, 2004).

Este protozoário parasito possui uma estrutura rígida e delgada, chamada axônema ou axostilo, que corre através da célula a partir da extremidade anterior até a extremidade posterior. Acredita-se que esta estrutura esteja envolvida na função de ancorar o parasito às VECs (Petrin *et al.*, 1998; Schwebke & Burgess, 2004). Além desta, também faz parte de sua

constituição o hidrogenossomo, organela onde ocorre a produção de Adenosina Trifosfato (ATP) (Petrin *et al.*, 1998; Maciel *et al.*, 2004; Schwebke & Burgess, 2004).

3.2.3. Ciclo de Vida

A infecção de humanos inicia-se principalmente através do coito. A partir deste, os trofozoítas dividem-se por fissão binária longitudinal, sem o desaparecimento da membrana nuclear (Petrin *et al.*, 1998; Schwebke & Burgess, 2004). O evento de divisão começa com a duplicação de organelas locomotoras selecionadas, seguida pelo desenvolvimento de duas organelas associadas ao núcleo, os cinetossomas, que flanqueiam ambos os lados do núcleo e, em seguida, se tornam os pólos para divisão. Dos cinetossomas, desenvolvem-se microtúbulos que estendem-se até o núcleo, aderindo aos centrômeros dos cromossomos. Também se estende entre os cinetossomas um fuso extra nuclear. Este fuso extra nuclear se alonga, e as células filhas se separam. Cada célula filha, então, produz as organelas restantes, originando uma população no lúmen e na superfície de mucosas do trato urogenital de humanos (Petrin *et al.*, 1998; Schwebke & Burgess, 2004).

2.2.4. Hidrogenossomo

O hidrogenossomo (Figura 1) é uma organela encontrada em organismos eucariontes que não apresentam mitocôndria, como por exemplo: *T. vaginalis* (Schneider *et al.*, 2011). Este protozoário é integrante de um dos gêneros mais utilizados para o estudo desta organela. Assim como as mitocôndrias, os hidrogenossomos também são delimitados por uma membrana dupla e ambos são funcionalmente semelhantes, pois produzem ATP. Esta produção de hidrogênio molecular se dá através de oxidação do piruvato ou malato (Müller, 1993). Por outro lado, estas duas organelas diferem em alguns aspectos, como: hidrogenossomos serem característicos de ambientes anaeróbicos e mitocôndrias de ambientes aeróbios (Bui *et al.*, 1996; Leitsch, 2016; Martin, 2005).

Esta organela foi descrita pela primeira vez em 1973, por Lindmark e Müller, na Universidade Rockefeller, no protozoário parasito *Tritrichomonas foetus* (Lindmark & Müller, 1973; Embley *et al.*, 2003). A partir disto, começa a

ser sugerido que a mesma possui origem endossimbiótica (Embley *et al.*, 2003). Em 1983, Benchimol e De Souza, descreveram que hidrogenossomos encontrados em *T. foetus* apresentam uma membrana dupla, mais um fator que indica a origem endossimbiótica desta organela (Embley *et al.*, 2003). Em 1996 são descritos mais dados sobre esta possível endossimbiose mitocondrial, dados de experimentos de nível molecular (Embley *et al.*, 2003).

Hidrogenossomos apresentam proteínas de choque térmico codificadoras para genes do tipo mitocondrial (Hsp70, Hsp60, Hsp10). E também são exibidas no genoma nuclear de *T. foetus*, com sequências assinatura também conservadas somente em mitocôndrias e algumas bactérias. É sabe-se que em aeróbios estas proteínas são essenciais em mitocôndrias (Embley *et al.*, 2003; Bui *et al.*, 1996).

Análises bioquímicas da Hsp60 hidrogenossomal mostraram semelhanças com proteínas de matriz mitocondrial codificadas no núcleo. Além disto, resultados de análises filogenéticas também indicaram que hidrogenossomos e mitocôndrias foram originados da mesma endossimbiose (Embley *et al.*, 2003; Bui *et al.*, 1996). Com a publicação do genoma de *T. vaginalis*, a ideia deste ancestral comum entre mitocôndria e hidrogenossomo volta à estar em foco (Leitsch, 2016).

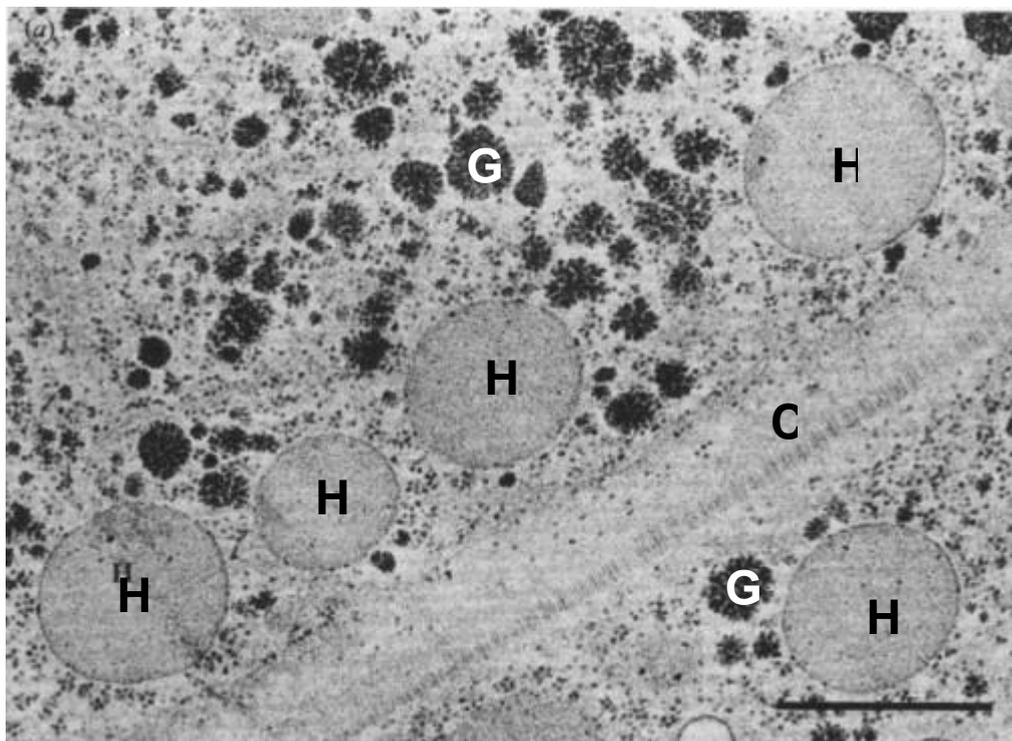


Figura 1: Hidrogenossomos em *Trichomonas vaginalis* (Müller, 1993). Hidrogenossomos (H), costa (C), e glicogênio (G) são observados no citoplasma do parasito. Barra 1 µm.

A morfologia do hidrogenossomos altera conforme o grupo. Em Trichomonadídeos e outros parabasalias é descrita como micro-corpos que exibem uma matriz relativamente uniforme. Estas organelas carecem de sistema de membranas interno extenso (Honigberg *et al.*, 1984 *apud* Benchimol & De Souza, 1983). Estas diferenças morfológicas podem interferir na natureza biológica dos hidrogenossomos de diferentes organismos (Honigberg *et al.*, 1984).

A enzima responsável pela oxidação do piruvato é a enzima piruvato: ferredoxina oxidoreductase (Muller, 1993). No mais, as enzimas hidrogenase e malato também são observadas em tricomonadídeos, entre outras. Com tantas enzimas específicas para seu processo de produção de ATP, é possível concluir que hidrogenossomos participam no metabolismo geral da célula significativamente (Muller, 1993).

2.2.4. Processo Infectivo

Atualmente, os estudos que envolvem *T. vaginalis* tem-se centrado sobre os acontecimentos iniciais necessários para estabelecer a infecção. Cogita-se que muitos mecanismos estão envolvidos no processo infectivo, estes incluem: adesão célula-célula, hemólise, excreção de fatores solúveis (como proteínas extracelulares). A interação de *T. vaginalis* com membros da flora residente da vagina pode ser um importante mecanismo utilizado para evadir o sistema imune do hospedeiro (Petrin *et al.*, 1998; Schwebke & Burgess, 2004; Da Costa *et al.*, 2005).

O passo inicial para a infecção é a adesão trichomonal às células hospedeiras, um processo multifatorial, no qual adesinas e proteinases desempenham importantes papéis. A citoaderência de *T. vaginalis* à mucosa vaginal é mediada por pelo menos 4 adesinas. Além disso, a atividade de proteinases parece ser necessária para que a adesão ocorra (Lehker & Sweeney, 1999; Rendon-Gandarilla *et al.*, 2013).

2.2.5. Morte celular por apoptose em *Trichomonas vaginalis*

Estudo prévio mostrou que *T. vaginalis* apresenta morte celular programada altamente semelhante à apoptose (Chose *et al.*, 2002). Quando a população de *T. vaginalis* é tratada com drogas indutoras de apoptose, ocorre morte celular nesta população de parasitos. A população que exhibe este tipo de morte mostra alterações morfológicas muito próximas às descritas em morte por apoptose como: fragmentação nuclear, surgimento de estruturas semelhantes à corpos apoptóticos e condensação de cromatina. Outro indício relevante, é que esta população apresenta exposição de PS na face externa da membrana plasmática do parasito, forte característica de morte apoptótica. Assim como, exibem DNA fragmentado (Chose *et al.*, 2002).

T. foetus também sofre processo de morte celular programada, com muitas semelhanças à apoptose, após tratamento com peróxido de hidrogênio (Mariante *et al.*, 2003). Foi descrito que, após o estresse causado pelo peróxido de hidrogênio a população deste parasito entram em processo de morte celular que possui os mesmos eventos envolvidos em morte por apoptose de células de metazoários. Dentre estes eventos observa-se fragmentação nuclear, alterações morfológicas (núcleo arredondado, hidrogenossomos eletrodensos, surgimento de figuras de mielina, intensa vacuolização, fragmentação do axóstilo, internalização de flagelo) e detecção da atividade de caspase-3. Todas estas semelhanças com apoptose aumentam mais ainda a necessidade de estudos sobre o tipo de morte apresentado por este parasito, para melhor elucidar a evolução do mesmo (Mariante *et al.*, 2003).

Também já foi observado o processo de morte celular sofrido por população de *T. foetus* tratada com o composto Griseofulvina capaz de tornar o ambiente estressante para o parasito e induzir morte celular. Porém esta morte difere da desencadeada por peróxido de hidrogênio, pois com esta droga não ocorre atividade da caspase. Após tratamento com esta droga, *T. foetus* apresenta *blebbings* de membrana, formação de corpos apoptóticos e fragmentação do núcleo, tamanho anormal da célula, flagelos internalizados, projeções da membrana plasmática, *blebbings* no envelope nuclear, vacuolização no citoplasma, projeções do núcleo, hidrogenossomos eletrodensos e membranosos, retículo endoplasmático contornando os vacúolos, complexo pelta-axóstilo mostra-se totalmente fragmentado, entre

outros eventos. Como citado, sob tratamento com esta droga, *T. foetus* não apresenta atividade da caspase, durante seu processo de morte celular, mas teve marcação positiva para exposição de PS na face externa da membrana plasmática. Todos estes eventos sugerem que este parasito possua mais de uma via capaz de induzir sua morte celular programada, ambas co-existindo no mesmo parasito (Mariante *et al.*, 2006).

2.3. Epitélio vaginal

O epitélio vaginal sofre diversas mudanças como: espessura do tecido, níveis de glicogênio intracelular, de ácido láctico, número de bactérias colonizando o lúmen vaginal, pH vaginal, entre outras, todas estas variando de acordo com o tempo de vida da mulher, a fase no ciclo menstrual, entre outros fatores (Farage & Maibach, 2006).

Na fase adulta, o epitélio da mucosa vaginal é pavimentoso e escamoso e com espessura entre 150 e 200 μm . Nesta fase, as VECs são estimuladas por estrógenos à sintetizar e armazenar glicogênio. Este glicogênio é liberado no lúmen vaginal conforme as VECs descamam. E então, bactérias que se encontram normalmente na vagina metabolizam este glicogênio produzindo ácido láctico. Este ácido é responsável pelo pH ácido da vagina, uma barreira protetora contra certos patógenos (Farage & Maibach, 2006).

Outra barreira protetora contra parasitos é a mucosa, formada principalmente por mucinas. No entanto, certos parasitos a atravessam e no epitélio vaginal ocorre a interação de *T. vaginalis* e com VECs (Lehker & Sweeney, 1999).

Em estudos anteriores constatou-se a presença de isoformas da enzima óxido nítrico sintase na vagina de mamíferos, inclusive na humana (Hoyle *et al.*, 1996; Al-Hijji *et al.*, 2000). Portanto, apesar de não existirem relatos específicos sobre a produção de NO, como agente microbicida, por VECs, é provável que isto aconteça, pois estudos prévios já demonstraram que VECs, assim como células de outros sítios do trato urogenital feminino, estimuladas por IFN- γ ou fator de necrose tumoral α exógenos, induzem ou regulam positivamente de forma significativa a expressão de muitas citocinas e quimiocinas (Interleucina-6, Interleucina-8), dentre outros eventos, sugerindo a participação destas células em funções imunológicas (Fichorova & Anderson, 1999). Estes achados

mostram que durante uma resposta inflamatória, acarretada, por exemplo, devido à infecção por *T. vaginalis*, o NO produzido pode não ser oriundo apenas de macrófagos recrutados por VECs para o epitélio vaginal, mas produzidos também por estas VECs (Hoyle *et al.*, 1996; Fichorova & Anderson, 1999). Além disto, estudos indicam que NO é capaz de regular a permeabilidade de VECs e que a produção de NO é oriunda de diversas fontes intracelulares, que desencadeiam mecanismos distintos de permeabilidade (Gorodeski & Haens, 2003).

2.4. Célula epitelial intestinal

A mucosa intestinal possui capacidade de absorver nutrientes essenciais do lúmen para o corpo e produzir muco e citocinas com características protetoras e sinalizadoras. Ambos os segmentos intestinais - intestino delgado e grosso (cólon) - apresentam processos patológicos divergentes, assim como susceptibilidade à fatores ambientais incluindo carcinogênese (Chopra *et al.*, 2010). Células do intestino delgado apresentam alta resistência à danos e, se danificadas, rapidamente são submetidas à processo apoptótico e então eliminadas para o lúmen (Chopra *et al.*, 2010). No entanto, células do cólon em replicação, podem sofrer mutações após danos causados por agentes tóxicos, levando à carcinogênese. Diferenciação e replicação celular do epitélio intestinal possuem barreiras espaciais de fenótipos distintos. O epitélio do intestino delgado consiste em vilosidades que se estendem até o lúmen. Este epitélio é composto principalmente de células mucosas e de absorção diferenciadas terminalmente, com criptas localizadas na base das vilosidades onde células em replicação incluem células tronco putativas (Chopra *et al.*, 2010).

Células epiteliais intestinais expressam a enzima iNOS, enzima crítica na síntese de NO, sendo sinergicamente estimuladas por fator de necrose tumoral e IFN- γ à nível transcricional. O silenciamento da STAT1, um importante fator de transcrição envolvido na sinalização por IFN- γ , ou inibição farmacológica de JAKS, quinases que fosforilam STATs, prevenindo a indução de iNOS e a produção de NO em resposta à estimulação à Lipopolissacarídeo (LPS)/IFN- γ foram significativamente aumentadas sob indução da oncogênica K-Ras (Stempelj *et al.*, 2007).

A expressão da enzima iNOS em IEC-6, necessita da via de sinalização JAK/STAT1, essencial para que ocorra esta expressão (Stempelj *et al.*, 2007). Foi descrito que IEC-6 tratadas com: INF- γ ou LPS apenas, não sofrem indução de expressão de iNOS, porém quando estas células são tratadas com a combinação de ambos, ocorre indução da expressão da enzima iNOS. Logo, os níveis de produção de NO, por esta iNOS em IEC-6 tratadas com esta combinação, também aumentaram. No mais, estes mesmo resultados se repetem, se a cultura de IEC-6 sofre previamente indução de sua sinalização via Ras. E esta capacidade de modulação da expressão de iNOS e de consequente produção de NO na cultura tratada com combinação de ambos INF- γ e LPS, se estende à nível transcricional. IEC-6 que tiveram sinalização Ras induzida e foram tratadas com combinação de INF- γ e LPS aumenta mais ainda a atividade transcricional relacionada à enzima iNOS, destas células. Além destes fatores analisados, para que ocorra expressão de iNOS e produção de NO em IEC-6, também não pode ocorrer inibição da via de sinalização JAK/STAT1, demonstrando desta maneira que esta via é essencial para a expressão de iNOS e produção de NO (Stempelj *et al.*, 2007).

Nosso grupo recentemente verificou que IEC-6 quando ativadas com IFN- γ e LPS produzem menos NO do que quando ativadas somente com IFN- γ (Huziwara, 2016). A expressão da enzima iNOS em IEC-6 ativadas com LPS e IFN- γ também é menor do que a expressão em IEC-6 ativadas apenas com IFN- γ . Ademais, observou-se que *T. gondii* quando infecta IEC-6 ativada por IFN- γ é capaz de reduzir a expressão de iNOS e inibir a produção de NO desta célula hospedeira. Portanto, a capacidade desse protozoário de inibir a produção de NO em macrófagos infectados (Seabra *et al.*, 2004) é a mesma quando infecta IEC-6 (Huziwara, 2016).

As células epiteliais são importantes, pois participam tanto da imunidade inata como na formação de barreiras contra invasão de parasitos (Vroling *et al.*, 2008). Um exemplo da participação das células epiteliais na imunidade adaptativa é sua capacidade de produzir NO (Eckmann *et al.*, 2000; Kwon & George, 1999). A IEC-6 é bom modelo pra estudo da interação com *T. vaginalis*, pois apresenta características de células epiteliais (receptores e baixo poder fagocítico), imunidade celular autônoma (produção de NO), sendo um tipo celular bastante utilizado em outros estudos.

2.5. Mimetismo apoptótico

Exposição de PS na superfície da membrana plasmática é forte indício de morte celular por apoptose (Martin *et al.*, 1995). É este evento que garante resposta anti-inflamatória, sinalizada e induzida por TGF- β 1, durante a fagocitose de células apoptóticas (Fadok *et al.*, 1992; Verhoven *et al.*, 1995). No entanto, certos protozoários expõem PS para induzir resposta anti-inflamatória das células hospedeiras e dessa forma escapar da ação microbicida dessas células.

Amastigotas de *L. amazonensis* expõem PS, induzindo síntese de TGF- β 1 e Interleucina-10 levando à uma ação anti-inflamatória em macrófagos do hospedeiro, reduzindo a produção de NO, conseqüentemente levando ao aumento da sobrevivência do parasito (de Freitas Balanco *et al.*, 2001). Neste trabalho foi proposto que a exposição de PS por amastigotas de *L. amazonensis* e a capacidade de inibir NO de macrófagos fosse conhecida como “mimetismo apoptótico” (de Freitas Balanco *et al.*, 2001). Em seguida, foi mostrado que amastigotas oriundos de diferentes linhagens de camundongo (BALB/c e C57BL/6) apresentam variação no nível de exposição de PS (Wanderley *et al.*, 2006). Amastigotas obtidas de BALB/c (que é susceptível a *L. amazonensis*) apresentam maior exposição de PS em relação ao obtido de C57BL/6 (resistente *L. amazonensis*). A exposição de PS por amastigotas é de extrema importância para que este seja internalizado por macrófagos do hospedeiro durante o processo de macropinocitose, etapa essencial para o processo infectivo deste parasito. Uma vez no interior do macrófago do hospedeiro, amastigota é capaz de regular a atividade microbicida deste macrófago aumentando a produção de TGF- β 1 e diminuindo a de NO, também devido à exposição de PS. Quanto maior o nível de PS exposto pelo parasito, maior sua interferência na ação microbicida do hospedeiro. A exposição de PS interfere na infectividade destas populações do parasito, de modo que populações que expõem mais PS são mais infectivas do que as populações com menor exposição de PS (Wanderley *et al.*, 2006).

Em promastigotas de *L. amazonensis*, a subpopulação PS+ é de parasitos que estão em processo de apoptose, evento natural de seu ciclo, divergindo normalmente do ocorrido em amastigotas deste protozoário, no qual

a subpopulação PS+ é a infectiva e não está entrando em processo de morte apoptótica (Wanderley *et al.*, 2009). No caso da forma promastigota, a subpopulação infectiva é a PS-, que por sua vez, necessita da subpopulação PS+ (apoptótica) para desativar macrófagos do hospedeiro mamífero. Foi proposto que a exposição de PS da subpopulação sofrendo apoptose é capaz de modular a resposta inflamatória de macrófagos garantindo o desenvolvimento da subpopulação PS- e o curso da doença (Wanderley *et al.*, 2009).

Já foi realizado estudo para melhor entender a relação entre exposição de PS e infectividade de *L. amazonensis* e as variações destes aspectos entre isolados deste parasito na doença Leishmaniose cutânea difusa (LCD) e em Leishmaniose cutânea localizada (LCL) (França-Costa *et al.*, 2012). Amastigotas de *L. amazonensis* isolados de LCD apresentam maior exposição de PS em comparação ao isolado de LCL. Isto confere aos parasitos de isolados de LCD maior índice de infectividade nos macrófagos do hospedeiro. Além disto, a exposição de PS por *L. amazonensis* possui correlação positiva com a modulação da produção de citocinas da célula hospedeira. Devido à maior exposição de PS em isolados de LCD, o mesmo também apresenta maior capacidade de modulação destas citocinas. Outro aspecto relacionado à exposição de PS por este parasito é o tamanho de seu vacúolo parasitóforo (esta estrutura é associada à resistência do parasito à ação microbida do macrófago infectado: quanto maior este vacúolo, maior à resistência parasitária). Maiores vacúolos foram encontrados nos isolados de LCD e não em LCL. Por último, notou-se que parasitos de isolados de LCD que expõem maior quantidade de PS, são os responsáveis pelos quadros mais graves, com maior número de lesões e persistentes desta doença. Estes dados permitem melhor compreender o mecanismo de evasão de *L. amazonensis* da resposta imune do macrófago infectado, as divergências entre o desenvolvimento de LCD e LCL durante infecção ao hospedeiro e as causas dos casos mais severos de LCD (França-Costa *et al.*, 2012).

T. gondii também faz uso da mimetização do processo apoptótico como mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro (Seabra *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2011). Assim como descrito para amastigotas de *L. amazonensis*, esta mimetização baseia-se na exposição de PS pela população deste

parasito, conferindo redução nos níveis de NO de macrófagos ativados infectados (Seabra *et al.*, 2002; 2004). Foi observado que 50% da população de taquizoítos de *T. gondii* expõe PS (Seabra *et al.*, 2004). A exposição deste fosfolípido diminui a produção de NO por macrófagos ativados, que foram infectados por estes taquizoítos. Ainda no mesmo estudo, para melhor entender esta diminuição, foi analisado mais detalhadamente a possível via de sinalização desencadeada para este fim. Observou-se que esta diminuição ocorre, pois o efeito autócrino de TGF- β 1, com consequente aumento da expressão de Smad 2 e 3 e saída de fator nuclear kappa beta do núcleo, nestes macrófagos, são desencadeados por esta exposição de PS do parasito. Além disto, mostrou-se que este mecanismo de evasão do parasito, abrange inclusive a expressão da iNOS de macrófagos, enzima responsável pela produção de NO da resposta imune do hospedeiro. No qual, macrófagos ativados infectados por *T. gondii*, apresentam redução na expressão de enzima iNOS, logo levando à diminuição na produção de NO. Indicando que, uma via de sinalização, envolvida na resposta imune do hospedeiro, e que é modulada por *T. gondii*, durante processo infectivo, é a via de TGF- β 1 (Seabra *et al.*, 2004), processo também descrito em *Leishmania* sp. (Barral-Netto *et al.*, 1992) e *T. cruzi* (Ming *et al.*, 1995).

Taquizoítos de *T. gondii*, ao contrário de promastigotas de *L. amazonensis*, possuem subpopulação PS+ infectiva (Santos *et al.*, 2011). Ainda sobre *T. gondii*, sabe-se que a exposição de PS, realizada somente por parte da população de taquizoítos deste parasito, garante o equilíbrio entre a ação efetora do hospedeiro e a persistência da infecção. Para melhor entender este mecanismo de evasão, as subpopulações PS+ e PS- de *T. gondii* foram separadas utilizando colunas magnéticas. Constatou-se que a subpopulação PS- destes taquizoítos entra nos macrófagos ativados através de fagocitose, pois o bloqueio deste processo reduz a quantidade de células com parasitos interiorizados. Já a subpopulação PS+ manteve sua taxa de invasão constante com o aumento do composto que inibe o processo fagocítico, indicando que a entrada dessa subpopulação é ativa. A inibição da produção de NO, em macrófagos ativados, ocorreu somente quando foi usada a subpopulação PS+ e a população total de *T. gondii*. Além disto, foram observados vacúolos "mais espaçosos" em macrófagos ativados, após interação com subpopulação PS- de

taquizoítos. Oposto foi visto em macrófagos após interação com subpopulação PS+, que apresentou vacúolos "apertados" (Santos *et al.*, 2011). Vacúolos "mais largos" são indicativo de fagocitose e vacúolos "mais apertados" indicam que estes parasitos invadem a célula através de penetração ativa (Morisaki *et al.*, 1995). Portanto, a morfologia do vacúolo contendo o parasito após a infecção das subpopulações nos macrófagos ativados indica que a exposição de PS+ é importante para a penetração ativa da *T. gondii*. Por último, foi descrito que, camundongos infectados apenas com as subpopulações separadas (PS+ ou PS), morriam mais rápido, do que os infectados com a população total de *T. gondii*. Sugerindo que, para haver uma relação equilibrada entre a resposta imune do hospedeiro e a continuidade da infecção, é necessário a atuação da população total de taquizoítos de *T. gondii* e não apenas a subpopulação PS+ ou PS- (Santos *et al.*, 2011).

O mimetismo apoptótico, também foi descrito em *Trypanosoma cruzi*. No caso deste protozoário parasito, a forma tripomastigota (independente de sua origem), tem 50% de sua população total PS+, enquanto as formas epimastigota e amastigota, não expõem PS (DaMatta *et al.*, 2007). Este dado vai de encontro ao registrado em *L. amazonensis*, no qual amastigotas e promastigotas metacíclicos apresentam marcação positiva para exposição de PS (Wanderley *et al.*, 2006). Provavelmente, esta divergência se deu em *T. cruzi*, pois sua forma tripomastigota necessita ser altamente infectiva, por ser a que abrange maior gama de hospedeiros (invertebrados e vertebrados). Em seguida, observou-se que macrófagos ativados infectados com tripomastigotas de *T. cruzi*, mostram Smad 2 fosforilada translocada para o núcleo, e também notou-se que após esta infecção, há inibição de expressão da enzima iNOS (responsável pela produção de NO) nestes macrófagos. Tudo isto sugere que *T. cruzi* possui mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro, e que este mecanismo é baseado na exposição de PS. Além disto, este mecanismo que é desencadeado pela exposição de PS, faz uso da via de sinalização de TGF- β 1 do macrófagos hospedeiro para inibir a expressão de iNOS, e consequente produção de NO. Resultando assim, em evasão da ação microbicida da resposta imune do hospedeiro. Estes resultados sugerem que, tripomastigotas de *T. cruzi* escapam da ação efetora da resposta imune do hospedeiro, evento que garante a continuidade desta infecção no interior de

macrófagos ativados infectados, permitindo a replicação de amastigotas intracelulares nestes macrófagos (DaMatta *et al.*, 2007).

O protozoário parasito *Plasmodium chabaudi* que infecta camundongos também foi descrito por apresentar mecanismo de evasão as ação microbicidas do hospedeiro baseada na exposição de PS (Rodrigues, 2016). Foi mostrado que a população de *P. chabaudi* purificada com saponina (detergente) de hemácias se apresenta 90% PS+ (Rodrigues, 2016). Diferentemente do que acontece na população de *T. gondii*, no qual apresenta um balanceamento entre a subpopulação PS- e PS+, responsável pela continuidade da infecção pois garante a sobrevivência do hospedeiro e do parasito (Santos *et al.*, 2011). Foi relatado que a interação entre a subpopulação PS+ de *P. chabaudi* e macrófagos ativados apresenta níveis aproximadamente nulos de NO, quando comparados a produção de macrófagos ativados que interagiram com a subpopulação PS+ bloqueada por anexina V (Rodrigues, 2016). Além disto, foi analisado a expressão de enzima iNOS em macrófagos após interações com a subpopulação PS+ e PS+ bloqueada com anexina V desse parasito. Verificou-se que a expressão de enzima iNOS é amplamente reduzida na interação com subpopulação PS+ em comparação com a subpopulação com a PS bloqueada. Estes resultados sugerem que a infecção por *P. chabaudi* possui capacidade de inibir a produção de NO do hospedeiro. Dando continuidade ao observado *in vitro*, foram realizados experimentos *in vivo*. Um grupo de camundongos foi infectado com subpopulação PS+ e outro com subpopulação PS+ bloqueada com anexina V. Constatou-se que o primeiro grupo de camundongos infectados exibe alta taxa de morte, enquanto o segundo grupo permanece vivo. A análise da parasitemia de ambos os grupos mostrou alta parasitemia nos camundongos infectado com a subpopulação PS+ a baixa nos camundongos inoculados com a subpopulação PS+ bloqueada. Logo, os eventos ocorridos *in vitro* e *in vivo*, sugerem que a exposição de PS por grande parte da população de *P. chabaudi* permite a modulação da resposta imune do hospedeiro, conferindo ao parasito uma forma de evadir da ação microbicida de macrófagos e persistir a infecção com êxito (Rodrigues, 2016).

Baseado nos relatos encontrados na literatura sobre exposição de PS como mecanismo de evasão da ação imune do hospedeiro, através da

modulação da produção de NO, nota-se que este mecanismo foi descrito em alguns outros protozoários parasitos, como *L. amazonensis* (Barral-Netto *et al.*, 1992; de Freitas Balanco *et al.*, 2001; Wanderley *et al.*, 2009; França-Costa *et al.*, 2012), *Toxoplasma gondii* (Seabra *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2011), *Trypanosoma cruzi* (DaMatta *et al.*, 2007) e *Plasmodium chabaudi* (Rodrigues, 2016). Portanto, é possível que o mimetismo apoptótico ou esta exposição de PS esteja presente em outros protozoários que tenham que lidar com células produtoras de NO durante seu ciclo de vida. Aqui testou-se se *T. vaginalis* expõem PS e se sua interação com IEC-6 ativada com IFN- γ foi capaz de inibir a produção de NO.

Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a exposição de PS de *T. vaginalis* e se esse fosfolípídeo é importante na regulação negativa de NO produzido por IEC-6 ativadas por INF- γ após interação.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar exposição de PS em trofozoítos de *T. vaginalis*;
- Analisar a produção de NO e a expressão da enzima iNOS por IEC-6 ativadas após interação com as subpopulações PS+, PS- e a população total de *T. vaginalis* (com PS bloqueado ou não);
- Avaliar a morfologia da interação de *T. vaginalis* com IEC-6.

4. Materiais e Métodos

4.1. Cultivo de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*

Os trofozoítos de *T. vaginalis* foram cultivados axenicamente em tubos de vidro de 8 mL contendo 7 mL de meio TYM (Trypticase-Yeast Extract-Maltose), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 h, que corresponde a fase de crescimento logarítmico dos parasitos. O tubo foi centrifugado (500 x g, 10 min), 6 ml do sobrenadante removido e novo meio suplementado com SFB adicionado. Para os experimentos, o sobrenadante foi coletado, evitando os 2 ml finais nos quais células mortas se decantavam, e centrifugado (500 x g, 10 min). O sedimento foi ressuscitado em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e os parasitos contados em câmara de Neubauer. Todas as observações de células vivas foram realizadas por microscopia óptica com contraste de fase utilizando microscópio óptico invertido Axiovert da Zeiss.

4.2. Análise da exposição de fosfatidilserina por *Trichomonas vaginalis*

Os parasitos foram incubados em tampão de cálcio (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4) contendo anexina V-FITC (1µg/10⁵ células) (Santa Cruz Biotechnology Inc., EUA) por 50 min e com iodeto de propídio (PI) (10µg/ml) por 5 min à temperatura ambiente antes de leitura no citômetro. O controle foi a leitura dos parasitos sem a presença de ambos marcadores. Após incubação, os parasitos foram analisados em citômetro de fluxo BD FACSCalibur. As análises em histograma e gráfico de pontos foram realizadas no programa WinMDI 2.8 para PC.

4.3. Isolamento de subpopulações PS+ e PS-

População total do parasito foi incubada com anexina V ligadas a microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec). Após 40 min, esta suspensão passou pela coluna magnética onde a subpopulação PS+ ficou retida na coluna enquanto a PS- atravessou a coluna sendo coletada e preservada. Logo em seguida a coluna magnética foi lavada com tampão de cálcio, removida do campo magnético e a subpopulação PS+ eluída com PBS, que foi coletada e preservada.

4.4. Cultivo de IEC-6

A linhagem de célula epitelial intestinal (IEC-6) de rato foi mantida em garrafas de cultura de célula de 25 cm² com DMEM, 10% SFB (Cripion Biotecnologia LTDA) inativado por calor (60°C por 1 h) e 1U/ml de insulina regular humana (Insunorm R, Insulina Humana Regular, Aspen Pharma) (100 UI/ml), mantidas em atmosfera de CO₂ à 37°C. Após formação de monocamada confluyente as células eram lavadas, removidas com tripsina-EDTA, e semeadas em novas garrafas.

4.5. Ativação de IEC-6 e interação com *Trichomonas vaginalis*

IEC-6 foram extraídas de garrafa de cultivo utilizando 1ml de tripsina por poucos segundos e adição de 4ml de DMEM com SFB. IEC-6 foram centrifugadas (500 x g, 10 min), o sedimento foi ressuspendido, as células contadas e plaqueadas em placa de 24 poços sobre lamínulas. IECs-6 foram ativadas com IFN- γ (800 U/ml) por 24 h (Huziwara, 2016), foram lavadas com PBS e interações com *T. vaginalis* foram realizadas por 1 h, na razão 10:1, *T. vaginalis*: IEC-6. As lamínulas foram lavadas com PBS e uma parte fixada em solução de formaldeído recém-preparado a 4% em PHEM, na outra parte foi adicionado meio DMEM suplementado com SFB, insulina e IFN- γ . Após 24 h e 48 h lamínulas foram removidas e fixadas.

4.6. Teste de viabilidade das IEC-6 após interação com *Trichomonas vaginalis*

Após interação de IEC-6 com *T. vaginalis* por 1 h, 24 h e 48 h, o meio de cultura dos poços foi removido, adicionado em cada poço 200 μ l de tripsina-EDTA, após 3 min o sobrenadante contendo as células de cada poço foi coletado, alocado em microtubos, e centrifugados por 5 min a 500 g. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos foram ressuspendidos em 10 μ l de DMEM, sendo adicionados em 40 μ l de solução de azul de tripan (0,05%). Foi transferido 10 μ l desta solução para a câmara de Neubauer. No microscópio de luz foram contadas as células vivas (não-coradas) e as mortas (coradas) em até 5 min. Foi então calculado a porcentagem de células vivas após cada situação experimental.

4.7. Análise da produção de óxido nítrico

O sobrenadante de cada poço da placa de 24 poços foi coletado após 1 h, 24 h e 48 h e homogeneizado em microtubo na proporção de 1:1 com reagente de Griess (1 volume de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% em água deionizada com igual volume de 0,1% N-[1-naftil] etilenodiamina em água deionizada). Após 10 min, a mistura foi lida em um leitor ELISA (540 nm) e os níveis de produção de NO foram quantificados baseado em uma curva padrão de nitrito de sódio em DMEM.

4.8. Imunofluorescência

Após interação de IEC-6 ativadas por IFN- γ com *T. vaginalis*, IEC-6 foram fixadas com formaldeído à 4% em PHEM por 10 min. As lamínulas foram lavadas 3 vezes com PHEM, permeabilizadas com Triton X-100 à 0,5% em PHEM por 15 min, em seguida foram lavadas 3 vezes com PHEM e incubadas com Cloreto de Amônio a 100mM em PHEM por 30 min. As células foram lavadas 3 vezes em PHEM contendo albumina sérica bovina (BSA) a 3% (PHEM BSA). As células foram incubadas por 1 h com anti-iNOS (Santa Cruz, sc-8310) diluído 1:100 em PHEM BSA, lavadas novamente 3 vezes em PHEM BSA, incubadas por 1 h com o marcador de F-actina *Phalloidin* conjugado à AlexaFluor® 568 e anti-coelho conjugado com AlexaFluor® 488, lavadas novamente 3 vezes em PHEM BSA. Após as incubações com os anti-corpos e *Phalloidin*, as células foram lavadas e montadas com ProLong® Gold antifade conjugado com o marcador intercalante de DNA DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Invitrogen) e observadas ao Microscópio Confocal a Laser (LSM-710, Zeiss).

4.9. Microscopia Eletrônica de Varredura

As lamínulas contendo as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30% - 100%), secas em ponto crítico de CO₂, recobertas com uma fina camada de ouro (25 nm de espessura), e observadas no microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6490LV.

5. Resultados

5.1. Subpopulação de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* expõe fosfatidilserina

A citometria de fluxo detectou que parte da população total de trofozoítos de *T. vaginalis* marcou com anexina V (Figura 2 A - vermelha), em comparação com o controle não incubado com anexina V (Figura 2 A - preto). Ademais, análises com trofozoítos incubados com anexina V e PI indicaram que aproximadamente 37% da população total de trofozoítos de *T. vaginalis* apresentaram-se anexina V positivos e PI negativos (Figura 2 B - vermelho).

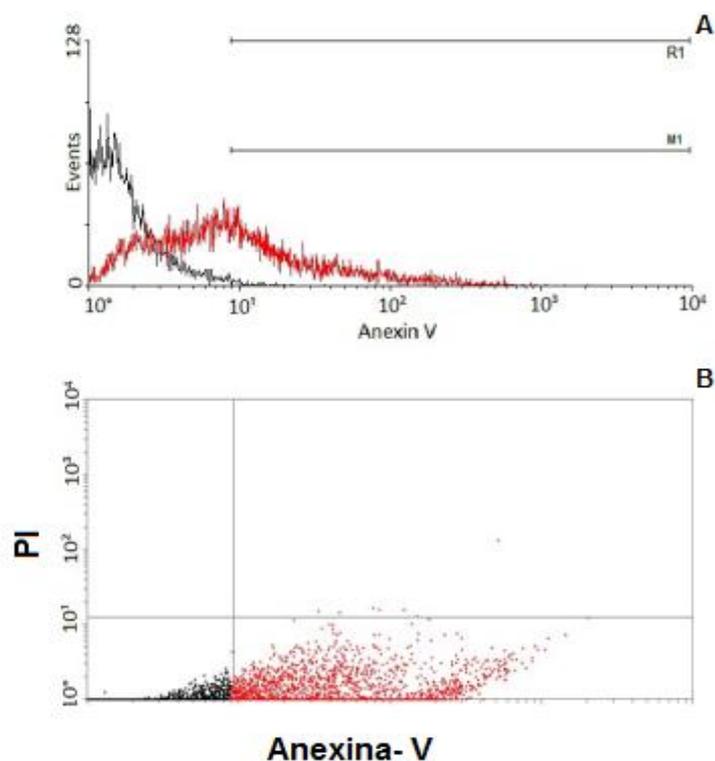


Figura 2. Exposição de fosfatidilserina em trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*. A. Observa-se uma subpopulação de *T. vaginalis* com marcação para anexina V (vermelho), em comparação com o controle sem a incubação com anexina V (preto). B. Trofozoítos incubados com anexina V e PI apresentaram cerca de 37% da população anexina V positiva e PI negativa (vermelho), e aproximadamente 61% da população apresentou marcação negativa para anexina V e para PI (preto). Eventos nos “gates” R1 e M1 em “A” estão marcados em vermelho em “B”.

5.2. IEC-6 continuaram viáveis após interação com *Trichomonas vaginalis*

Não houve alteração da viabilidade das IEC-6 ativadas após interação com *T. vaginalis*. Após 1 h a porcentagem de IEC-6 viável foi de 98%, 95% após 24 h e 93% após 48 h de interação com o parasito.

5.3. *Trichomonas vaginalis* inibe produção de óxido nítrico de IEC-6 via exposição de fosfatidilserina

5.3.1. População total do parasito incubada com anexina V

Após 1 h de interação não foi detectado diferença na concentração de nitrito no sobrenadante das IEC-6 comparando células ativadas sem parasito (controle), com parasito bloqueado com anexina V, ou parasito sem bloqueio (Figura 3). No entanto, após 24 h de interação, parasitos sem bloqueio por anexina V produziram menos nitrito do que IEC-6 não infectada e IEC-6 que interagiu com parasito bloqueado por anexina V (Figura 3). Após 48 h, IEC-6 que interagiu com parasito bloqueado produziu mais nitrito do que as IEC-6 que interagiram com parasito sem bloqueio (Figura 3).

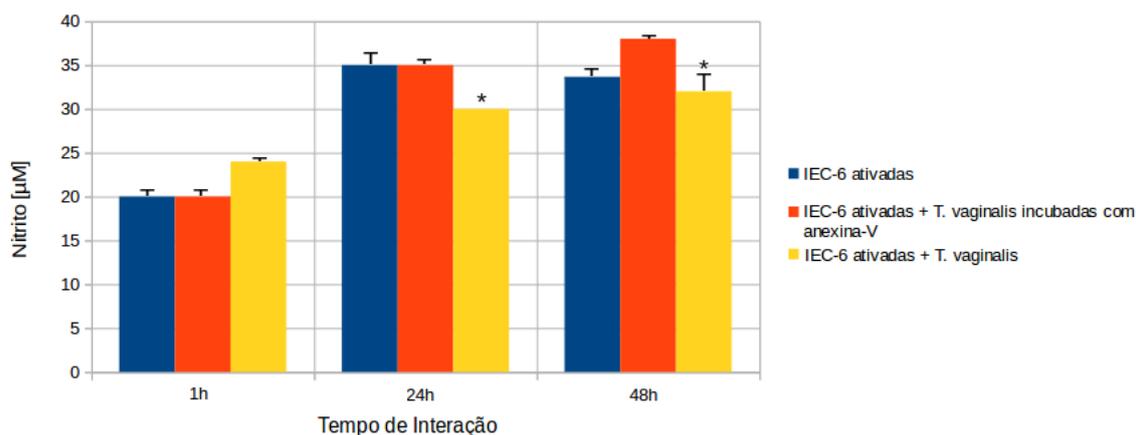


Figura 3. Quantificação de nitrito por IEC-6 ativadas após interação com *Trichomonas vaginalis*. A interação de IEC-6 com o parasito foi realizada por 1 h, 24 h e 48 h, o sobrenadante foi coletado e a produção de nitrito avaliada. IEC-6 interagiu com parasito incubado com anexina V (laranja), sem (amarelo), ou não interagiu com parasito (azul) (controle). Houve redução nos níveis de nitrito de IEC-6 após 24 e 48 h de interação com *T. vaginalis* sem incubação com anexina V, enquanto a presença de anexina V durante a interação não alterou os níveis de nitrito produzidos pelas IEC-6.

5.3.2. Subpopulações do parasito isoladas

A população total de trofozoítos de *T. vaginalis* foi separada em subpopulações PS+ e PS- de forma satisfatória, obtendo-se em torno de 40 % de trofozoítos PS+ e 60% de PS- (dados não mostrados). O nitrito produzido pelas IEC-6 ativadas foi dosado após interação com as diferentes subpopulações de PS de trofozoítos de *T. vaginalis* e comparado com IEC-6 que não interagiram com parasitos. Observou-se que IEC-6 que não interagiram com parasito e após 1 h de interação com as subpopulações de *T. vaginalis* PS+ ou PS- produziram níveis similares de nitrito (Figura 4). No entanto, após 24 h e 48 h de cultivo de IEC-6 que interagiu com a subpopulação PS+ de *T. vaginalis* apresentou menor produção de nitrito que IEC-6 que não interagiu com os parasitos (Figura 4), enquanto que IEC-6 que interagiu com a subpopulação PS- de *T. vaginalis* apresentou produção similar em relação as IEC-6 não infectadas (Figura 4).

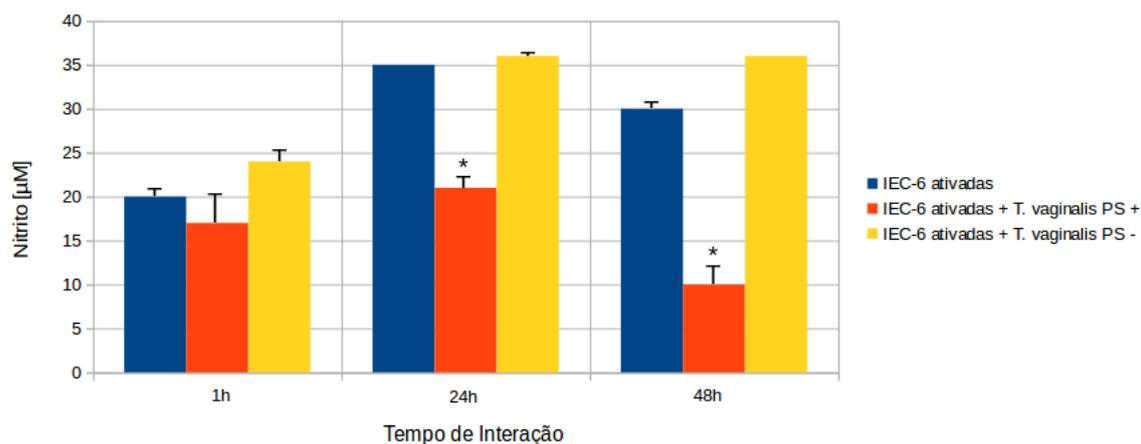


Figura 4. Quantificação de nitrito por IEC-6 ativadas após interação com subpopulação PS de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*. As interações foram realizadas como na figura 3, no entanto, foram usadas a subpopulação PS+ (laranja) e subpopulação PS- (amarelo). Após 24 h e 48 h houve redução da produção de nitrito de IEC-6 ativadas que interagiu com a subpopulação PS+ de *T. vaginalis*.

5.4. Interação de IEC-6 ativadas com *Trichomonas vaginalis* reduziu a expressão de oxido nítrico sintase induzida, mas não alterou filamentos de actina

A expressão de iNOS em IEC-6 ativada foi avaliada após interação com trofozoítos da população total de *T. vaginalis*. Observou-se que a expressão de iNOS em IEC-6 após 24 h de interação com *T. vaginalis* foi similar a IEC-6 ativadas sem o parasito (Figura 5 A e B). Entretanto, após o período de 48h de interação, foi observado diminuição da marcação de iNOS em IEC-6 que interagiram com *T. vaginalis* em comparação com IEC-6 ativadas sem o parasito (Figura 5 C e D). Não foi detectado alteração dos filamentos de actina das IEC-6 após interação com o parasito (Figura 5).

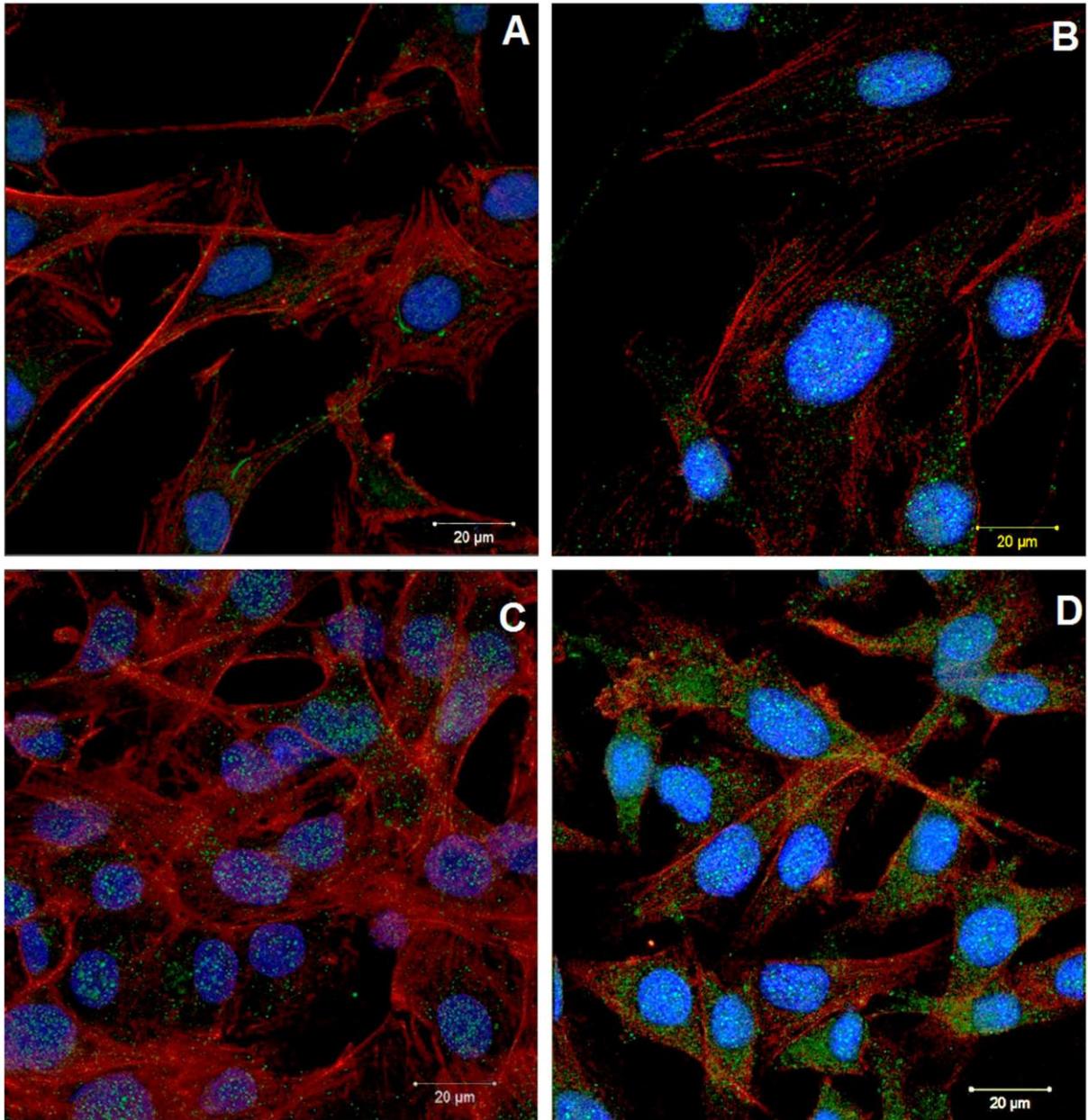


Figura 5. Expressão de oxido nítrico sintase induzida (verde) e filamentos de actina (vermelho) em IEC-6 ativadas (núcleo azul). IEC-6 após interação com *Trichomonas vaginalis* por 24 h (A). IEC-6 sem parasito após 24 h (B). IEC-6 após interação com *T. vaginalis* por 48 h (C). IEC-6 sem o parasito após 48 h (D). Note clara redução da expressão de iNOS após 48h de interação com o parasito.

5.5. Análise ultraestrutural da interação de *Trichomonas vaginalis* com células IEC-6 ativadas

Observou-se a íntima interação dos parasitos nas IEC-6 ativadas após 24h de interação (Figuras 6 A, B e C), e em 48 h de interação, observou-se o espalhamento de *T. vaginalis* sobre as IEC-6 (setas nas figuras 6 D, E e F).

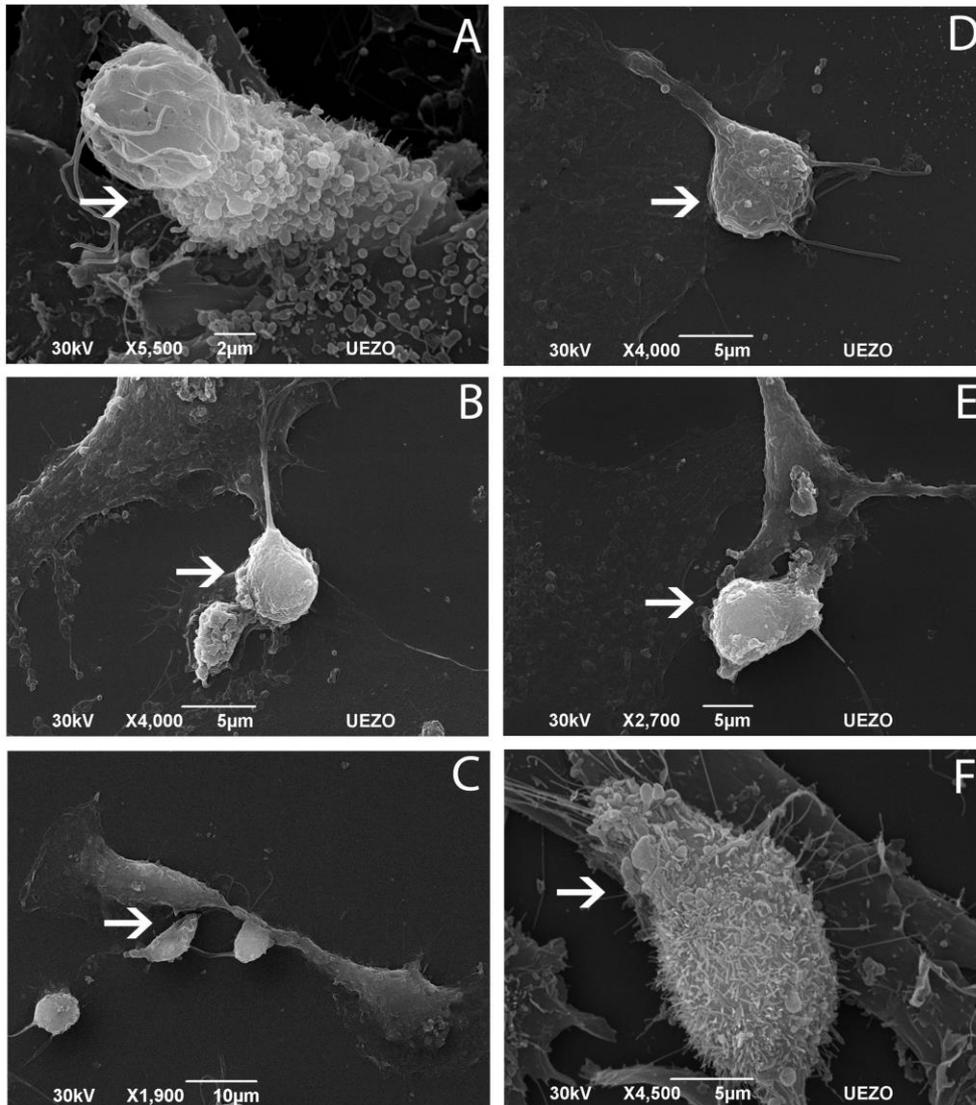


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura da interação de *Trichomonas vaginalis* com IEC-6 ativadas. Após 24 h de interação observou-se a adesão dos parasitos à célula (seta em A, B, C), e após 48h de interação os parasitos espalharam sobre a célula (seta em D, E, F).

6. Discussão

A Tricomoníase é uma das mais importantes doenças sexualmente transmissível não viral (WHO, 2001). Esta doença geralmente apresenta-se de forma agressiva em mulheres, com resposta imune celular local que causa inflamação no epitélio vaginal e na uretra do homem (Shafir *et al.*, 2009). Durante a infecção é possível observar mudanças significantes nas camadas celulares epiteliais da vagina, e frequentemente, pequenas feridas são encontradas, que podem ser resultantes do dano causado por este parasito (Vilela & Benchimol 2012). Apesar disso, existem poucos estudos sobre a resposta da célula pela infecção de *T. vaginalis* e o comportamento do parasito diante desta interação. Aqui avaliou-se a interação de *T. vaginalis* com IEC-6 ativadas por IFN- γ verificando se a exposição de PS está envolvida neste processo. Analisou-se que *T. vaginalis* expõe PS na face externa de sua membrana, reduz a expressão de iNOS e produção NO de IEC-6 ativadas, além de apresentar íntima relação com a essa célula hospedeira durante a interação. Esses dados indicam que a exposição de PS pode ser mecanismo evasivo bastante comum.

Verificou-se que 37% da população total de trofozoítos de *T. vaginalis* apresentou marcação positiva para anexina V e negativa para PI. Este resultado mostra que nestes trofozoítos a membrana plasmática se encontrava íntegra (PI negativa) e que o sinal de anexina V foi decorrente da exposição de PS na face externa da membrana do parasito. Portanto, ficou claro que parte da população de *T. vaginales* expôs PS. Foi descrito que a exposição de PS na face externa da membrana da célula é um forte sinal de morte programada por apoptose (Martin *et al.*, 1995), evento crucial para que a fagocitose desta célula ocorra por células vizinhas ou fagócitos profissionais (Verhoven *et al.*, 1995). Ademais, a exposição de PS induz sinalização de TGF- β 1 que no caso de macrófagos os deixa menos microbicidas evitando inflamação devido a captação de células apoptóticas (Fadok *et al.*, 1992; Verhoven *et al.*, 1995). Alguns protozoários parasitos mimetizam a exposição de PS e o sinal desativador de TGF- β 1, porém sem entrar em processo de morte celular apoptótica. Esses protozoários fazem uso desse mecanismo para auxiliar a evasão da resposta imune do hospedeiro e possibilitar a persistência da infecção. Exemplos de parasitos e suas formas que têm esse mecanismo

evasivo são: amastigotas de *L. amazonensis* (de Freitas Balanco *et al.*, 2001; Wanderley *et al.*, 2006), taquizoítos de *T. gondii* Seabra *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2011), e tripomastogotas de *T. cruzi* (DaMatta *et al.*, 2007). Como informado, esse mecanismo é chamado de mimetismo apoptótico. No entanto, outros protozoários parasitos usam mecanismo similar, que envolve exposição de PS, mas é drasticamente distinto de mimetismo apoptótico, pois não envolve morte celular por apoptose. Parte da população de promastigotas de *L. amazonensis* expõem PS+, pois estão entrando em processo de apoptose, por meio disto desativam macrófagos via sinal de TGF- β 1, permitindo a infecção e conversão em amastigotas da subpopulação de promastigotas que está viva e não expõe PS (Wanderley *et al.*, 2009). Esta forma de evadir da ação efetora dos macrófagos é radicalmente distinta de mimetismo apoptótico e chamada de “morte celular altruística” (Wanderley *et al.*, 2009). *P. chabaudi* também foi descrito como capaz de expor PS e de interferir na resposta imune do macrófago, beneficiando a continuidade da infecção (Rodrigues, 2016). Porém não se sabe se a exposição, nestes casos, é mimetismo apoptótico ou morte celular altruística, pois não foi verificado nesses parasitos se parte da população apresenta características morfológicas e bioquímicas de apoptose, necessitando de mais estudos (Rodrigues, 2016). Aqui, viu-se que há uma subpopulação PS+ de trofozoítos de *T. vaginalis*, o mesmo que ocorre em todos os outros parasitos mencionados anteriormente (de Freitas Balanco *et al.*, 2001; Wanderley *et al.*, 2009; Seabra *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2011; DaMatta *et al.*, 2007; Rodrigues, 2016) porém, assim como em *P. chabaudi* (Rodrigues, 2016), são necessários mais estudos para melhor entender se a subpopulação PS+ de *T. vaginalis* causa mimetismo apoptótico ou morte celular altruística. Foi demonstrado que esse parasito sofre morte celular por apoptose (Chose *et al.*, 2002). Portanto, é bem possível que a subpopulação PS+ de *T. vaginalis* esteja em apoptose. Para determinar se o que ocorre com *T. vaginalis* é mimetismo apoptótico ou morte celular altruística é necessário a realização de ensaios que analisem a fragmentação do DNA (TUNEL, e eletroforese de DNA purificado em gel de agarose) e o grau de heterocromatina e eucromatina do núcleo dessas células (microscopia eletrônica de transmissão). Esses ensaios irão verificar se os parasitos PS+ estão em

processo de morte por apoptose ou não o que determinaria se o que ocorre com esse parasito é mimetismo apoptótico ou morte celular altruística.

Os níveis de nitrito produzidos por IEC-6 ativadas por IFN- γ após interação com a população total de trofozoítos de *T. vaginalis* são menores do que os níveis produzidos por IEC-6 ativadas sem interação (controle), à partir dos pontos de 24h e 48h, e os níveis de nitrito de IEC-6 ativadas após interação com população total de *T. vaginalis* com PS bloqueada com anexina V não foram diferentes dos níveis observados no controle em nenhum dos pontos observados. Ademais, a subpopulação PS+ foi capaz de inibir produção de NO pelas IEC-6 nos pontos de 24h e 48h da interação, enquanto a subpopulação PS- não. Esse conjunto de resultados mostra que durante interação de IEC-6 ativadas com *T. vaginalis* (população total ou subpopulação PS+) ocorre redução dos níveis de NO produzidos pelas células hospedeiras. Esses dados sugerem que este parasito interfere na ação efetora do hospedeiro via exposição de PS, reduzindo a produção de NO, garantindo assim sua persistência na célula hospedeira infectada. Esta mesma interferência do parasito na produção de NO, beneficiando a continuidade da infecção, já foi descrita em outros protozoários parasitos, como: *L. amazonensis* (de Freitas Balanco *et al.*, 2001), *T. gondii* (Seabra *et al.*, 2002; Seabra *et al.*, 2004; Huziwara, 2016), *T. cruzi* (DaMatta *et al.*, 2007) e *P. chabaudi* (Rodrigues, 2016). Já foi descrito que NO produzido por macrófagos ativados por IFN- γ e LPS está envolvido na resposta imune do hospedeiro, atuando como efector para neutralizar a infecção em curso (Stuehr & Marletta, 1985; Nathan, 1992; Bogdan *et al.*, 2000). Além disto, sabe-se que células da linhagem IEC-6 quando ativadas por IFN- γ e LPS ou apenas IFN- γ , também são capazes de produzir NO como forma de neutralizar uma infecção (Bogdan, 2001; Forsythe *et al.*, 2002; Stempelj *et al.*, 2007; Huziwara, 2016). Portanto, reduzir os níveis de NO produzidos pela célula hospedeira é de extrema importância para a sobrevivência do parasito no hospedeiro sendo uma característica selecionada positivamente durante a evolução. E como mencionado, estudos prévios comprovam esta intensa relação entre desenvolvimento bem sucedido do processo infectivo do parasito com a capacidade deste parasito de reduzir os níveis de NO da célula hospedeira (de

Freitas Balanco *et al.*, 2001; Seabra *et al.*, 2002; Seabra *et al.*, 2004; Huziwara, 2016; DaMatta *et al.*, 2007; Rodrigues, 2016).

Também observou-se que após 24h de interação entre IEC-6 ativadas e *T. vaginalis* a expressão da enzima iNOS foi similar à expressão no controle não infectado. Porém, após 48h de interação houve redução na expressão de iNOS em comparação ao controle. Isto mostra que a redução da produção de NO pela IEC-6 ativada após interação com o parasito detectada com 24h foi devido ao não funcionamento da iNOS, já que continuava presente. No entanto, com 48h de interação, a menor produção de NO foi causada pela redução da expressão de iNOS. O dado de 48h corrobora como outros descritos para situações envolvendo macrófagos ativados infectados com *T. gondii* (Seabra *et al.*, 2002; 2004) e *P. chabaudi* (Rodrigues, 2016), e IEC-6 ativada infectada com *T. gondii* (Huziwara, 2016). Sabe-se que iNOS é uma das 3 enzimas responsável pela produção de NO em diversas células, sendo que esta isoforma é a única induzida e atuante na resposta imune (Knowles & Moncada, 1994). A produção de NO desempenha ação efetora na neutralização do agente infectivo (Bogdan *et al.*, 2000). Portanto, ao reduzir a expressão desta enzima, durante infecção, conseqüentemente a produção de NO, a ação efetora desse gás é diminuída, favorecendo a continuidade da infecção. Esta redução da expressão também já foi observada quando outros protozoários parasitos infectam células produtoras de NO (Seabra *et al.*, 2004; Wanderley *et al.*, 2006; DaMatta *et al.*, 2007; Rodrigues, 2016; Huziwara, 2016). Esta observação em todos estes protozoários é mais um indício que sugere a capacidade destes parasitas de modular a ação da resposta imune do hospedeiro, não apenas no final da via de produção de NO, mas desde etapas anteriores.

Observou-se através de Microscopia Eletrônica de Varredura a adesão de *T. vaginalis* à IEC-6 no ponto de 24h e o espalhamento do parasito no ponto de 48h, demonstrando íntima interação entre *T. vaginalis* e a célula hospedeira. Isso corrobora com o descrito na literatura no qual a mudança morfológica do parasito após adesão à célula hospedeira, da sua forma livre trofozoíta (elipsoidal) para forma amebóide, ocorre em IEC-6. Esta mudança interfere em uma série de fatores relevantes ao processo infectivo do parasito. Com a nova forma mais espalhada, o parasito ganha mais sítios de contato com a célula em

que se encontra aderido (Arroyo et al., 1993), possivelmente possibilitando maior capacidade de modulação das vias de sinalização desta célula epitelial. Portanto, a forma amebióide assumida por *T. vaginalis* após interação com IEC-6 pode significar aumento do contato da PS exposta com sítios de reconhecimento das IEC-6 garantindo o sinal antiinflamatório que desativa células hospedeiras. Ademais, foi descrito a ocorrência de sinalização para produção de adesinas em maior quantidade no parasito (Arroyo et al., 1993). E esta produção é positivamente relacionada ao aumento da citoaderência de *T. vaginalis*. Além disto, à partir do primeiro parasito aderido à célula hospedeira, rapidamente esta célula hospedeira passa à estar colonizada por mais parasitos (Arroyo et al., 1993). Portanto, o demonstrado neste trabalho e o que é descrito na literatura, propõem que o evento de aderência de *T. vaginalis* à IEC-6, desencadeia uma mudança morfológica neste parasito (da forma elipsoidal para amebóide) e que esta nova morfologia é de extrema importância no curso da infecção e está interligado à vários outros processos.

7. Conclusão

Este trabalho demonstra que *T. vaginalis* expõe PS por parte de sua população de trofozoítos interferindo positivamente na infecção da IEC-6. Essa exposição de PS reduz a produção de NO por IEC-6 ativadas por IFN- γ caracterizando um mecanismo de evasão da ação efetora da célula hospedeira. Além disto, demonstra-se que este parasito interfere na produção de NO à nível de expressão enzimática, reduzindo a expressão da iNOS. Este trabalho também reforça a íntima relação entre adesão deste parasito à célula hospedeira e mudança morfológica para forma amebóide. Esta mudança morfológica possivelmente influencia no processo infectivo. Sendo assim, todos estes eventos, indicam que *T. vaginalis* pode ser mais um exemplo de protozoário parasito que apresenta o recurso de mimetismo apoptótico ou morte celular altruística, já descrito em outros protozoários parasitos, porém para futuras afirmações, mais estudos se fazem necessários.

8. Referências Bibliográficas

Al-Hijji J.; Larsson B.; Batra S. Nitric oxide synthase in the rabbit uterus and vagina: hormonal regulation and functional significance. **Biology of Reproduction**. 2000; 62: 1387–1392.

Al-Salihi F. L.; Curran J. P.; Wang J. Neonatal *Trichomonas vaginalis*: report of three cases and review of the literature. **Pediatrics**. 1974; 53 (2): 196-200.

Anjaeyulu R.; Gupte S. A.; Desai D. B. Single-dose treatment of trichomonal vaginitis: a comparison of tinidazole and metronidazole. **The Journal of international medical research**. 1977; 5 (6): 438-41.

Arroyo R.; Gonzdlez-Robles A.; Martinez-Palomo A.; Alderete J. F. Signalling of *Trichomonas vaginalis* ior amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. **Molecular Microbiology**. 1993; 7 (2): 299-309.

Barcinski M. A.; Moreira M. E. C.; BALANCO J. M. F.; Wanderley J. L. M. ; Bonomo A. The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior? **Kinetoplastid Biology and Disease**. 2003; 2 (1): 6.

Barral-Netto M.; Barral A.; Brownell C. E.; Skeiky Y. A.; Ellingsworth L. R.; Twardzik D. R.; Reed S. G. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**. 1992; 257 (5069): 545-8.

Benchimol M.; De Souza W. Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. **The Journal of Protozoology**. 1983; 30 (2):422-5.

Bogdan C.; Röllinghoff M.; Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**. 2000; 173: 17–26.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**. 2001; 2(10): 907-916

Bui E. T.; Bradley P. J.; Johnson P. J. A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 1996; 93(18): 9651–9656.

Catterall R. D.; Nicol C. S. Is Trichomonal Infestation a Venereal Disease? **British Medical Journal**. 1960; 1(5180): 1177–1179.

Chopra D. P.; Dombkowski A. A.; Stemmer P. M.; Parker G. C. Intestinal Epithelial Cells In Vitro. **Stem Cells and Development**. 2010; 19(1): 131–141.

Chose O.; Noël C.; Gerbod D.; Brenner C.; Viscogliosi E.; Roseto A. A form of cell death with some features resembling apoptosis in the amitochondrial unicellular organism *Trichomonas vaginalis*. **Experimental Cell Research**. 2002; 276 (1): 32-9.

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. A.; Klebanoff M. A.; Rao A. V.; Rhoads G. G. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. **The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Sexually transmitted diseases**. 1997; 24(6):353-60.

Cudmore S. L.; Delgaty K. L.; Hayward-McClelland S. F.; Petrin D. P.; Garber G. E. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clinical microbiology reviews**. 2004; 17(4):783-93.

Da Costa R. F.; de Souza W.; Benchimol M.; Alderete J. F.; Morgado-Diaz J. A. *Trichomonas vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells. **Cell research**. 2005; 15(9):704-16.

DaMatta R. A.; Seabra S. H.; Deolindo P.; Arnholdt A. C. V.; Manhães L.; Goldenberg S.; De Souza W. Trypanosoma cruzi exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. **FEMS microbiology letters**. 2007; 266(1):29-33.

de Freitas Balanco J. M.; Moreira M. E.; Bonomo A.; Bozza P. T.; Amarante-Mendes G.; Pirmez C.; Barcinski M. A. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Current Biology**. 2001; 11 (23): 1870-3.

Dunne R. L.; Dunn L. A.; Upcroft P.; O'Donoghue P. J.; Upcroft J. A. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan Trichomonas vaginalis. **Cell research**. 2003; 13(4): 239-49.

Eckmann L.; Laurent F.; Langford T. D.; Hetsko M. L.; Smith J. R.; Kagnoff M. F.; Gillin F. D. Nitric Oxide Production by Human Intestinal Epithelial Cells and Competition for Arginine as Potential Determinants of Host Defense Against the Lumen-Dwelling Pathogen Giardia lamblia. **The Journal of Immunology**. 2000; 164: 1478–1487.

El-Shazly A. M.; El-Naggar H. M.; Soliman M.; El-Negeri M.; El-Nemr H. E.; Handousa A. E.; Morsy T. A. A study on Trichomoniasis vaginalis and female infertility. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. 2001; 31(2): 545-53.

Embley T. M., van der Giezen M. Horner D. S.; Dyal P. L.; and Foster P. Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B**. 2003; 358 (1429): 191–202.

Fadok V. A.; Voelker D. R.; Campbell P. A.; Cohen J. J.; Bratton D. L.; Henson P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **Journal of immunology**. 1992; 148(7): 2207-16.

Farage M.; Maibach H. Lifetime changes in the vulva and vagina. **Archives of gynecology and obstetrics**. 2006; 273(4): 195-202.

Fichorova R. N.; Anderson D. J. Differential expression of immunobiological mediators by immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. **Biology of reproduction**. 1999; 60(2): 508-14.

Forsythe R. M.; Xu D. Z.; Lu Q.; Deitch E. A. Lipopolysaccharide-induced enterocyte-derived nitric oxide induces intestinal monolayer permeability in an autocrine fashion. **Shock**. 2002; 17(3):180-4.

França-Costa J, Wanderley JL, Deolindo P, Zarattini JB, Costa J, Soong L, Barcinski MA, Barral A, Borges VM. Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. **PLoS One**. 2012;7(5):e36595.

Gorodeski G. I.; Haens G. Nitric oxide regulation of permeability in human cervical and vaginal epithelial cells and in human endothelial cells. **Current pharmaceutical design**. 2003; 9(5):411-8.

Grodstein F.; Goldman M. B.; Cramer D. W. Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. **American journal of epidemiology**. 1993; 137(5):577-84.

Honigberg B. M.; Volkmann D.; Entzeroth R.; Scholtyseck E. A freeze-fracture electron microscope study of *Trichomonas vaginalis* Donné and *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller). **The Journal of Protozoology**. 1984; 31 (1): 116-31.

Hoyle C. H.; Stones R. W.; Robson T.; Whitley K.; Burnstock G. Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide-containing nerves. **Journal of anatomy**. 1996; 188(3): 633–644.

Huziwara, JCA. Envolvimento do óxido nítrico e da autofagia na inibição do crescimento de *Toxoplasma gondii* em células epiteliais intestinais. Tese de

doutorado defendida em 2016. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, UENF.

Kissinger. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. **BMC Infectious Diseases**. 2015; 15: 307.

Knowles R. G.; Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochemical Journal**. 1994; 298 (Pt 2): 249-58.

Kwon S.; George S. C. Synergistic Cytokine-Induced Nitric Oxide Production in Human Alveolar Epithelial Cells. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**. 1999; 3 (4): 348–357.

Lehker M. W.; Sweeney D. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. **Sexually transmitted infections**. 1999; 75 (4): 231-8.

Leitsch D. Recent Advances in the *Trichomonas vaginalis* Field. **F1000Research**. 2016; 5

Lindmark D. G.; Müller M. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**. 1973; 248 (22): 7724-8

Maciel G. P.; Tasca T.; De Carli G. A. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**. 2004; 40(3): 152-60.

Mariante R. M.; Guimarães C. A.; Linden R. Benchimol M. Hydrogen peroxide induces caspase activation and programmed cell death in the amitochondrial *Tritrichomonas foetus*. **Histochemistry and Cell Biology**. 2003; 120 (2): 129-41.

Mariante R. M.; Vancini R. G.; Benchimol M. Cell death in trichomonads: new insights. **Histochemistry and Cell Biology**. 2006; 125 (5): 545-56.

Martin S. J.; Reutelingsperger C. P.; McGahon A. J.; Rader J. A.; van Schie R. C.; LaFace D. M.; Green D. R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **The Journal of Experimental Medicine**. 1995; 182(5): 1545-56.

Martin W. The missing link between hydrogenosomes and mitochondria. **Trends in Microbiology**. 2005;13 (10): 457-9.

McClelland R. S.; Sangare L.; Hassan W. M.; Lavreys L.; Mandaliya K.; Kiarie J.; Ndinya-Achola J.; Jaoko W.; Baeten J. M. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. **The Journal of infectious diseases**. 2007; 195 (5): 698-702.

Ming M, Ewen ME, Pereira MEA. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF β signaling pathway. **Cell**. 1995; 82: 287–296.

Müller M. The hydrogenosome. **Journal of General Microbiology**. 1993; 139 (12): 2879-89

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **The FASEB Journal**. 1992; 6 (12): 3051-64.

Nielsen M. H.; Nielsen R. Electron microscopy of *Trichomonas vaginalis* Donné: interaction with vaginal epithelium in human trichomoniasis. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Scand B**. 1975; 83 (4): 305-20.

Padrão Jda C, Cabral GR, da Silva Mde F, Seabra SH, DaMatta RA. *Toxoplasma gondii* infection of activated J774-A1 macrophages causes inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome pathway. **Parasitology International**. 2014 63(5): 659-63.

Petrin D.; Delgaty K.; Bhatt R.; Garber G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical microbiology reviews**. 1998; 11(2): 300-17.

Rendón-Gandarilla F. J.; Ramón-Luing L. de L.; Ortega-López J.; Rosa de Andrade I.; Benchimol M.; Arroyo R. The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. **BioMed research international**. 2013; 1-18.

Rodrigues, Pedro Souto. Subpopulação positiva para fosfatidilserina de *Plasmodium chabaudi* modula negativamente a produção de óxido nítrico em macrófagos ativados. Dissertação de mestrado defendida em 2016. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, UENF.

Santos T. A. T.; Portes J. A.; Damasceno-Sá J. C.; Caldas L. A.; De Souza W.; DaMatta R. A.; Seabra S. H. Phosphatidylserine Exposure by *Toxoplasma gondii* Is Fundamental to Balance the Immune Response Granting Survival of the Parasite and of the Host. **Plos one**. 2011; 6(11): e27867.

Sayed el-Ahl S. A.; el-Wakil H. S.; Kamel N. M.; Mahmoud M. S. A preliminary study on the relationship between *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer in Egyptian women. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. 2002; 32: 167–178.

Schwebke J. R.; Burgess D. Trichomoniasis. **Clinical microbiology reviews**. 2004; 17 (4): 794-803.

Schneider R. E.; Brown M. T.; Shiflett A. M.; Dyall S. D.; Hayes R. D.; Xie Y.; Loo J. A.; Johnson P. J. The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. **International Journal for Parasitology**. 2011; 41 (0): 1421–1434.

Seabra S. H.; de Souza W.; DaMatta R. A. Toxoplasma gondii partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. **Experimental parasitology**. 2002; 100(1): 62-70.

Seabra S. H.; de Souza W.; Damatta R. A. Toxoplasma gondii exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. **Biochemical and biophysical research communications**. 2004; 324(2): 744-52.

Shafir S. C.; Sorvillo F. J.; Smith L. Current issues and considerations regarding trichomoniasis and human immunodeficiency virus in African-Americans. **Clinical Microbiology Reviews**. 2009; 22 (1): 37-45.

Sorvillo F.; Kerndt P. Trichomonas vaginalis and amplification of HIV-1 transmission. **Lancet**. 1998; 351 (9097): 213-4.

Sorvillo F.; Kovacs A.; Kerndt P.; Stek A.; Muderspach L.; Sanchez-Keeland L. Risk factors for trichomoniasis among women with human immunodeficiency virus (HIV) infection at a public clinic in Los Angeles County, California: implications for HIV prevention. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. 1998; 351 (9097): 213-4.

Stark J. R.; Judson G.; Alderete J. F.; Mundodi V.; Kucknoor A. S.; Giovannucci E. L.; Platz E. A.; Sutcliffe S.; Fall K.; Kurth T.; Ma J.; Stampfer M. J.; Mucci L. A. Prospective study of Trichomonas vaginalis infection and prostate cancer incidence and mortality: **Physicians' Health Study**. **Journal of the National Cancer Institute**. 2009; 101 (20): 1406-11.

Stempelj M.; Kedinger M.; Augenlicht L.; Klampfer L. Essential role of the JAK/STAT1 signaling pathway in the expression of inducible nitric-oxide synthase in intestinal epithelial cells and its regulation by butyrate. **The Journal of biological chemistry**. 2007; 282: 9797-9804.

Stuehr D. J.; Marletta M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proceedings of The National Academy of Sciences**. 1985; 82 (22): 7738-42.

Sutcliffe S.; Giovannucci E.; Alderete J. F.; Chang T. H.; Gaydos C. A.; Zenilman J. M.; De Marzo A. M.; Willett W. C.; Platz E. A. Plasma antibodies against Trichomonas vaginalis and subsequent risk of prostate cancer. **Cancer, epidemiology, biomarkers & prevention**. 2006; 15 (5): 939-45.

Verhoven B.; Schlegel R. A.; Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**. 1995; 182 (5): 1597-601.

Vilela R. C.; Benchimol M. Trichomonas vaginalis and Tritrichomonas foetus: interaction with fibroblasts and muscle cells - new insights into parasite-mediated host cell cytotoxicity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2012; 107 (6): 720-7.

Vroiling A. B.; Fokkens W. J.; van Drunen C. M. How epithelial cells detect danger: aiding the immune response. **Allergy**. 2008; 63: 1110–1123.

Wanderley J. L.; Moreira M. E.; Benjamin A.; Bonomo A. C.; Barcinski M. A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. **The Journal of Immunology**. 2006; 176 (3): 1834-9.

Wanderley J. L.; Pinto da Silva L. H.; Deolindo P.; Soong L.; Borges V. M.; Prates D. B.; de Souza A. P.; Barral A.; Balanco J. M.; do Nascimento M. T.; Saraiva E. M.; Barcinski M. A. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. **PLoS One**. 2009; 4 (5): e5733.

World Health Organization. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections Overview and Estimates. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**. 2001; 1-50.

World Health Organization. Global Incidence and Prevalence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. 2008. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**. 2012; 1–28.

Yap E. H.; Ho T. H.; Chan Y. C.; Thong T. W.; Ng G. C.; Ho L. C.; Singh M. Serum antibodies to *Trichomonas vaginalis* in invasive cervical cancer patients. **Genitourinary medicine**. 1995; 71 (6): 402–404.

Zhang Z. F.; Graham S.; Yu S. Z.; Marshall J.; Zielesny M.; Chen Y. X.; Sun M.; Tang S. L.; Liao C. S.; Xu J. L.; Yang X. Z. *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer. A prospective study in China. **Annals of epidemiology**. 1995; 5(4):325-32.