



**Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional**

**Dissertação de Mestrado Acadêmico**

**Microvesículas e Nanotubos de Tunelamento em *Trichomonas vaginalis* em cultivo axênico e durante interação com células vaginais**

**Júlio César Santana de Andrade**

Duque de Caxias

2022

**Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional**

**Dissertação de Mestrado Acadêmico**

**Microvesículas e Nanotubos de Tunelamento em *Trichomonas vaginalis* em cultivo axênico e durante interação com células vaginais**

**Júlio César Santana de Andrade**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Biomedicina Translacional (UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO), como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Marlene Benchimol e do Prof. Wanderley de Souza.

Duque de Caxias

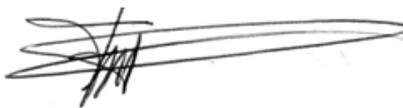
2022

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às 14 horas, do dia 27 de janeiro de 2022, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, realizou sessão, em ambiente virtual de Defesa da Dissertação de versando sobre o projeto intitulado “Microvesículas e Nanotubos de Tunelamento em *Trichomonas vaginalis* em cultivo axênico e durante interação com células vaginais”, de autoria de Júlio César Santana de Andrade, aluno do Mestrado Acadêmico, sob orientação da Professora Marlene Benchimol e do Professor Wanderley de Souza. A sessão foi aberta pelo Prof. Fábio da Silva de Azevedo Fortes, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof. Celso Barbosa Sant’Anna e Prof<sup>a</sup>. Ivone Rosa de Andrade. Em seguida, passou à palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, o candidato foi arguido pelos examinadores e suas respostas foram consideradas **SATISFATÓRIAS**.

O presidente declarou o mestrando Júlio César Santana de Andrade **APROVADO**, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, de acordo como o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, em que foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

Duque de Caxias, 27 de janeiro de 2022.



---

Prof. Dr. Fábio da Silva de Azevedo Fortes  
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – UEZO  
Presidente da Banca



---

Prof. Dr. Celso Barbosa de Sant’Anna Filho  
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivone Rosa de Andrade  
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO

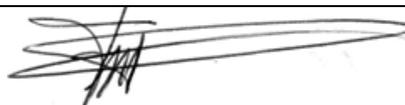


---

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo  
Coordenador Geral do Programa de  
Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS

**(i) Aprovado com Ressalvas e Modificações**

Comentários:



Presidente:

**CATALOGAÇÃO NA FONTE**  
**UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS**

T263n

de Andrade, Júlio Cesar Santana.

Microvesículas e Nanotubos de Tunelamento em *Trichomonas vaginalis* em cultivo axênico e durante interação com células vaginais / Júlio Cesar Santana de Andrade. – Duque de Caxias, 2022.

117 f. : il. ; color.

Dissertação (Mestrado em Biomedicina Tradicional) – UNIGRANRIO. Escola de Ciências da Saúde, 2022.

“Orientadora: Profa. Dra. Marlene Benchimol; Dr. Wanderley de Souza.

Referências: f. 93.

1. *Trichomonas vaginalis*. 2. microvesículas. 3. nanotubos. 4. interação parasito-hospedeiro. I. Benchimol, Marlene. II. De Souza, Wanderley. III. Título.

CDD -610.28

**Este trabalho é dedicado:**

À minha mãe, pela luta e todo apoio prestado.

Aos meus avós maternos (*in memoriam*), pelo afeto que me acalenta até nos dias de hoje.

## **AGRADECIMENTOS**

### **Aos familiares e amigos**

Aos meus pais, Júlio e Vanúbia, pelo apoio e suporte em toda minha vida. Quando o assunto é resiliência, vocês me inspiram muito. Em especial, agradeço a minha mãe pelo carinho, paciência e todo o cuidado. Amo vocês.

Aos meus tios, Ildemir e Vivian, meus pais emprestados, pelo carinho, respeito e acolhimento de sempre. Vocês me resgatam e devolvem o sentido as coisas simples. Obrigado por tudo!

A Aline Lorete, que me tem como caçula. Obrigado por abrir as portas para mim. Obrigado por me apresentar as possibilidades, por me instruir quando se fez necessário e por tanto me apoiar. Seu cuidado comigo, inclusive nos momentos de socorro, foram essenciais para eu não abandonar o barco quando me senti fraco.

Ao meu “grupo de apoio”, Carolina, Evelyn, Larissa, Mariana, Rayane, Sara, Tayná e Vitória, por cada conversa sem sentido, desabafos e ligações. Obrigado a todas por me salvar, sempre que necessário.

Por último, mas não menos importante, agradeço a Matheus Cruz, por ser meu apoio diário, pela força, companhia e por tanto amor que me proporciona. Obrigado por ser você e pela paciência (extrema) que tem comigo.

### **Ao Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer e colaboradores**

Todos os dias vividos neste laboratório foram, para mim, uma experiência única. Por toda contribuição à pesquisa internacional, aos avanços, dentre outros.

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Narcisa, pela gentileza e cuidado, por sempre estar disposta a ajudar com o manuseio do equipamento mais simples que seja. A Prof<sup>a</sup>. Márcia Attias pelas curiosidades e gentilezas ao longo destes anos. A Prof<sup>a</sup>. Miria Pereira pelo carinho e ensinamentos, inclusive no manuseio das centrífugas e ultracentrífugas para fracionamento celular. A Prof<sup>a</sup>. Susana Frases, por todo carinho e ensinamentos no DLS, mesmo trazendo a mesma dúvida diversas vezes, sempre estive disposta a sanar todas as questões.

Aos colaboradores técnicos, Luiz Otávio, Noêmia Rodrigues, Sharmila Ortiz e Verônica Santos, por todos os ensinamentos e apoio nas diversas técnicas que dominam. Em especial, agradeço a Noêmia pelas caronas, conversas, conselhos, imenso carinho e experiências compartilhadas. Aqui fiz uma amiga para o resto da minha vida.

Ao grupo Anaeróbios, nas pessoas da Prof<sup>a</sup>. Ana Paula Gadelha, Raphael Verdán e Tatiana Guinancio, pelo compartilhamento de conhecimento. Em especial, a Tatiana (Tati!) por ser tão única, pelos puxões de orelha e pelos cuidados comigo. Te amo e amarei Tarcísio, igualmente.

Aos demais colegas do LUCHM, pela troca diária de conhecimentos, apoio e algumas cervejas fora do expediente. Em especial, agradeço a Alexia, Aline Zuma, Camila Wendt, Carlla, Carol, Cupmila, Dario, Juliana Portes, Juliana Vidal, Marcus Aquino, Normanda, Paula Bandeira, Tatiana Araújo e Thayane.

Aos doutores Ivone Andrade e Victor Midlej, por me introduzir as técnicas básicas que me impulsionariam a seguir com o desenvolvimento do projeto. Todo comprometimento de vocês será sempre lembrado. Muito obrigado pelos ensinamentos e paciência.

Ao grupo de tecnólogos da UMA (Unidade de Microscopia Avançada) do Cenabio 3, Adélia Belém, Daniel Costa, Jean Pierre, Lorian Straker e Sara Teixeira, pelo apoio e ensinamentos para uso dos microscópios eletrônicos.

Ao Dr. Braulio Archanjo (DIMAT/INMETRO) pelo total suporte no uso do microscópio de varredura de alta resolução de íon Hélio. Todas as observações neste equipamento abrilhantam nossos resultados.

Aos colaboradores do Laboratório de Proteômica, na pessoa do Prof. Gilberto Domont, Prof. Fábio Nascimento e a doutoranda (quase Dr<sup>a</sup>.) Patricia Sosa, pelos ensinamentos sobre proteômica e seu processamento. Vertente do projeto que se iniciou há pouco tempo e que seguirá, certamente, colhendo bons frutos.

## **AGRADECIMENTOS CIENTÍFICOS**

À Prof<sup>ª</sup>. Marlene Benchimol, pela oportunidade de crescer profissionalmente. Mesmo que pareça pouco, todo o processo fez uma diferença imensurável em minha vida. Me faltam palavras, fico tímido e grato, muito grato. Grato pelos conselhos e pelos “tapas”, como diz. Aprendi muito sobre lidar com as frustrações e como reagir aos momentos mais negativos. Hoje, sem dúvidas, dou muito mais valor ao trabalho científico. Ainda sou um jovem curioso, mas não saio da mesma forma que entrei e espero ser um pouco melhor. Difícil exprimir o tamanho da admiração que construí pela senhora, profissionalmente por tudo o que proporcionou à ciência, aos avanços, por ensinar com prazer de transferir conhecimentos e pela seriedade que conduz seus trabalhos. Obrigado, professora. Foi e é uma honra.

Ao Prof. Wanderley de Souza, por abrir as portas de seu laboratório e também me aceitar em sua equipe. É uma honra ser orientado por essa dupla de pesquisadores. Seu brilhantismo e amor pela ciência me causam admiração desde graduando, quando o via apenas de longe, na palestra dentro da Academia Nacional de Medicina. Obrigado pela paciência e pelas horas de conversas sobre experimentos e discussões de resultados.

Ao programa de pós-graduação em Biomedicina Translacional pela oportunidade de cursar o Mestrado Acadêmico, tendo o prazer de aprender com diferentes perfis de pesquisadores e professores nas várias vertentes das Ciências Biomédicas. Especialmente, ao Prof. Sergian Vianna Cardozo, coordenador geral do programa, pelos conhecimentos transmitidos em aula e pela solicitude, sempre que precisávamos de suporte.

Aos doutores Celso Sant’Anna e Emile Barrias pela importante troca de conhecimentos ao longo da qualificação. Agradeço por todas as sugestões, pois foram fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação.

Às agências de fomento CNPq, CAPES, FINEP e FAPERJ, pelo apoio financeiro prestado ao laboratório e seus anexos, em momentos de muita resistência científica. À FAPERJ, me estendo para agradecer pela concessão da bolsa.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas, Graças a Deus, não sou o que era antes.”*

(Marthin Luther King)

## RESUMO

*Trichomonas vaginalis* é um protozoário flagelado extracelular e o agente etiológico da tricomoníase humana, uma infecção sexualmente transmissível (IST) de alta incidência, sendo cosmopolita e de maior prevalência no sexo feminino, podendo provocar partos prematuros e infertilidade. A doença também leva a uma maior predisposição à infecção pelos vírus HIV e HPV. Devido a importância clínica deste protozoário, é de interesse obter novos conhecimentos sobre o processo de sua interação com as células hospedeiras. Recentemente, tem sido amplamente discutida a participação de vesículas extracelulares como intervenientes na comunicação intercelular. Dentre estas vesículas, microvesículas e exossomos demonstraram alto potencial em modular a comunicação entre as células, bem como a resposta do hospedeiro às infecções. Além destas, o envolvimento de nanotubos de tunelamento podem modular a comunicação a distância entre as células, como já descrito em outros protozoários. No presente estudo, para analisar a biologia celular dos processos de secreção das vesículas extracelulares e projeção de nanotubos em *T. vaginalis* e de sua interação com células de mamífero *in vitro*, foram utilizadas técnicas de espalhamento dinâmico de luz, microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, além da análise por microscopia de varredura de alta resolução com íons Hélio. Duas cepas de tricomonas, que apresentam diferentes níveis de patogenicidade, foram submetidas à indução da secreção de vesículas extracelulares utilizando cloreto de cálcio e ionóforo de cálcio, onde também foram observadas a projeção de estruturas semelhantes a nanotubos de tunelamento. Com isso, foi possível isolar e caracterizar morfológicamente vesículas secretadas por *T. vaginalis*, tanto de modo constitutivo quanto induzidas, analisar a projeção de estruturas semelhantes a nanotubos e observar possíveis danos causados durante a interação deste parasita com células epiteliais vaginais *in vitro*.

**Palavras-chave:** *Trichomonas vaginalis*; microvesículas; nanotubos; interação parasito-hospedeiro.

## ABSTRACT

*Trichomonas vaginalis* is an extracellular flagellate protozoan and the etiologic agent of human trichomoniasis, a sexually transmitted infection (STI) with a high incidence, being cosmopolitan and more prevalent in females, which can cause premature births and infertility. The disease also leads to a greater predisposition to HIV and HPV infection. Due to the clinical importance of this protozoan, it is of interest to obtain new knowledge about the process of its interaction with host cells. Recently, the participation of extracellular vesicles as players in intercellular communication has been widely discussed. Among these vesicles, microvesicles and exosomes showed high potential in modulating cell-to-cell communication as well as the host response to infections. In addition to these, the involvement of tunneling nanotubes can modulate the distance communication between cells, as already described in other protozoa. In the present study, to analyze the cellular biology of the processes of secretion of extracellular vesicles and projection of nanotubes in *T. vaginalis* and their interaction with mammalian cells *in vitro*, dynamic light scattering, transmission and scanning electron microscopy techniques were used. In addition to analysis by high resolution scanning microscopy with Helium ions. Two strains of trichomonas, which show different levels of pathogenicity, were subjected to induction of extracellular vesicle secretion using calcium chloride and calcium ionophore, where the projection of structures similar to tunneling nanotubes were also observed. Thus, it was possible to isolate and morphologically characterize vesicles secreted by *T. vaginalis*, both constitutively and induced, analyze the projection of nanotube-like structures and observe possible damage caused during the interaction of this parasite with vaginal epithelial cells *in vitro*.

**Keywords:** *Trichomonas vaginalis*; microvesicles; nanotubes; host-parasite interaction.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1. <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	11
1.2. EPIDEMIOLOGIA .....	12
1.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	14
1.4. DIAGNÓSTICO.....	15
1.5. TRATAMENTO .....	17
1.6. MORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA .....	19
1.6.1. Núcleo.....	21
1.6.2. Retículo Endoplasmático .....	22
1.6.3. Hidrogenossomos.....	22
1.6.4. Complexo de Golgi .....	23
1.6.5. Citoesqueleto.....	24
1.6.5.1. Filamentos Parabasais .....	24
1.6.5.2. Complexo Pelta-Axóstilo.....	24
1.6.5.3. Costa .....	25
1.6.5.4. Flagelos .....	26
1.6.6. Vacúolos e Lisossomos .....	26
1.6.7. Membrana plasmática .....	27
1.7. PATOGENICIDADE DE <i>T. VAGINALIS</i> .....	27
1.7.1. Co-infecção viral .....	27
1.7.2. Citoaderência de <i>T. vaginalis</i> e sua interação com células hospedeiras ....	28
1.8. VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	32
1.8.1. Exossomos e microvesículas em protozoários patogênicos .....	35
1.8.1.1. Exossomos e microvesículas em <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	37
1.8.2. Nanotubos de tunelamento.....	40

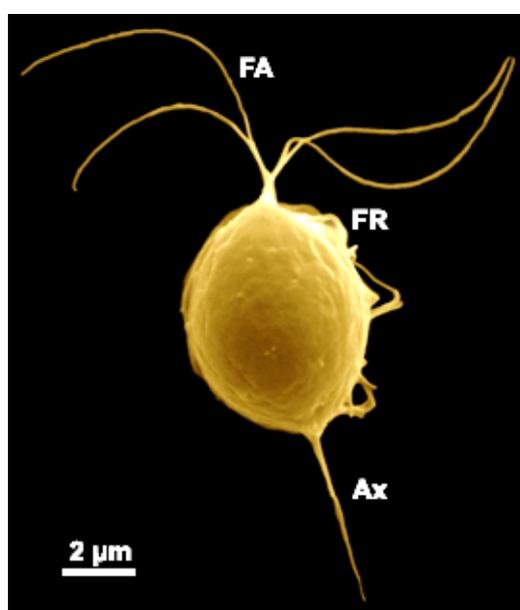
2. JUSTIFICATIVA .....	42
3.1. Objetivo Geral.....	43
3.2. Objetivos Específicos .....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	44
4.1. Cultivos celulares.....	44
4.1.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>T. vaginalis</i> .....	44
4.1.2. Cultivo <i>in vitro</i> da Linhagem Celular Humana HMVII .....	44
4.2. Secreção e obtenção de microvesículas secretadas por <i>T. vaginalis</i> .....	45
4.2.1. Microvesículas secretadas de modo constitutivo .....	45
4.2.2. Indução da secreção de vesículas extracelulares .....	46
4.2.3. Coleta do sobrenadante das culturas em tratamento com CaCl <sub>2</sub> e ionóforo de cálcio.....	46
4.3. Ensaio de interação .....	47
4.3.1. Experimentos de co-incubação .....	47
4.4. Espalhamento Dinâmico de Luz.....	47
4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	48
4.6. Microscopia de Varredura de alta resolução com íons Hélio .....	48
4.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	48
4.7.1. Contrastação Negativa .....	48
4.7.2. Processamento de rotina para MET .....	49
5. RESULTADOS .....	50
5.1. Análise topográfica de <i>T. vaginalis</i> em processo de secreção de MVs estimulado por CaCl <sub>2</sub> e ionóforo de cálcio.....	50
5.2. Observações ultraestruturais de <i>T. vaginalis</i> em processo secretório induzido por CaCl <sub>2</sub> e ionóforo de cálcio .....	60
5.3. Morfologia das microvesículas liberadas por <i>T. vaginalis</i> .....	69
5.4. Ensaio de interação entre <i>T. vaginalis</i> e células hospedeiras .....	74

6. DISCUSSÃO .....	85
7. CONCLUSÕES .....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Trichomonas vaginalis*

*Trichomonas vaginalis* é um protozoário flagelado e extracelular (Fig. 1), pertencente ao filo Parabasalia, família Trichomonadidae e gênero *Trichomonas*. Pode ser encontrado em diferentes hospedeiros vertebrados, como mamíferos, aves e répteis. Este parasita é considerado um microaerófilo, uma vez que sobrevive na ausência de oxigênio, mas que suporta e permanece em crescimento na presença de pequenas quantidades desse elemento (SCHWEBKE e BURGESS, 2004).



**Figura 1.** Imagem ultraestrutural de *Trichomonas vaginalis* por microscopia eletrônica de varredura (MEV), demonstrando estruturas do parasita. FA, flagelos anteriores; MO, membrana ondulante; FR, flagelo recorrente; Ax, axóstilo (Foto de M. Benchimol).

*T. vaginalis* foi descrita pela primeira vez por Alfred Donné (DONNÉ, 1836), um bacteriologista e médico francês, que encontrou este protozoário em mulheres, sendo a maioria delas prostitutas, que estariam acometidas por diversas doenças do trato urogenital. No início, acreditava que se tratava de uma doença exclusiva do sexo feminino e somente em 1894 é que a tricomoníase foi descrita em homens. Atualmente, a tricomoníase é a infecção urogenital sexualmente transmissível não viral mais comum que afeta homens e mulheres (FICHOROVA, 2009).

Quatro espécies de *Trichomonadídeos* são consideradas parasitas humanos: *Trichomonas vaginalis* (encontrado no trato urogenital), *Trichomonas tenax* (localizado na cavidade oral), *Pentatrichomonas hominis* e *Dientamoeba fragilis* (que podem ser encontrados no trato digestivo). No entanto, *T. vaginalis* é considerada a mais patogênica, capaz de infectar o trato urogenital dos seres humanos, infecção esta conhecida como tricomoníase (SCHWEBKE, 2002; COLEMAN et al., 2013; MARITZ et al., 2014). *T. tenax* passou a ser considerada um parasita patogênico aos seres humanos, uma vez que foi demonstrada sua capacidade de provocar danos celulares em experimentos utilizando células MDCK, células HeLa, células gengivais e esferóides 3D, de modo semelhante a *T. vaginalis* (RIBEIRO et al., 2015). A tricomoníase pulmonar, uma infecção oportunista causada por *T. tenax*, é geralmente inofensiva; no entanto, pode se tornar grave em pacientes com higiene oral inadequada. Doenças periodontais, como gengivite e periodontite, resultantes da interrupção da homeostase do microbioma oral do hospedeiro, frequentemente desencadeiam a infecção por *T. tenax*. O protozoário pode aderir às células epiteliais e produzir diversas enzimas que causam a degradação periodontal (BISSON et al., 2019).

## 1.2. EPIDEMIOLOGIA

A tricomoníase humana é uma doença cosmopolita de transmissão sexual. As infecções sexualmente transmissíveis estão entre as doenças transmissíveis mais comuns e afetam a saúde e a vida das pessoas em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) disponibiliza estimativas periódicas para analisar a carga global de quatro das infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) curáveis mais comuns: Clamídia (*Chlamydia trachomatis*), Gonorréia (*Neisseria gonorrhoeae*), Sífilis (*Treponema pallidum*) e Tricomoníase (*Trichomonas vaginalis*) (NEWMAN et al., 2015; WIJESOORIYA et al., 2016). Como a tricomoníase não é uma doença notificável e não há recomendações disponíveis para o rastreamento geral de *T. vaginalis*, a epidemiologia da tricomoníase vem em grande parte de estudos de vigilância populacional e clínica (MUZNY et al., 2014).

A tricomoníase é uma IST de alta incidência. A OMS estima uma incidência de 276 milhões de novos casos a cada ano e prevalência de 187 milhões de indivíduos infectados (MENEZES et al., 2016; AQUINO et al., 2020), tornando esta

incidência responsável por quase metade do total de aquisições de infecções sexualmente transmissíveis (ROWLEY et al., 2019). A doença afeta ambos os sexos, mas é mais prevalente em mulheres em idade reprodutiva do que em homens (WHO, 2018). No entanto, essas taxas tendem a subestimar a prevalência real de casos, dadas as altas taxas de infecções sem sintomatologia aguda, ou seja, assintomáticas, e que a tricomoníase muitas vezes não é relatada, mesmo em países desenvolvidos (REGAN et al., 2020). Apesar da transmissão ser majoritariamente por via sexual, existem relatos que também pode ser transmitida, embora raramente, através de objetos, como: material de higiene pessoal, vaso sanitário e piscinas (PEREIRA-NEVES e BENCHIMOL, 2008; HARP e CHOWDHURY, 2011).

A coleta de dados epidemiológicos significativos sobre a infecção por *T. vaginalis* se torna difícil pelo fato de que não é necessário a notificação da tricomoníase, tanto em países desenvolvidos ou em desenvolvimento (POOLE e MCCLELLAND, 2013). Sendo assim, a prevalência global e local das taxas de infecção são estimadas a partir de estudos locais. A prevalência e a incidência da infecção por *T. vaginalis* são geograficamente variáveis (Tabela 1), com maior prevalência encontrada na África (20,2% das mulheres, 2% dos homens) e nas Américas (22% das mulheres, 2,2% dos homens). A prevalência na Europa é estimada em 5,8% das mulheres e 0,6% dos homens (OMS, 2012; ROWLEY et al., 2019).

**Tabela 1. Estimativas globais de novos casos de ISTs curáveis em 2016**

<b>Infecção Sexualmente Transmissível</b>	<b>Nº (milhão)</b>
Clamídia	127
Gonorréia	87
Sífilis	6
Tricomoníase	156
<b>Total</b>	<b>376</b>

**Fonte:** ROWLEY et al., 2019.

A prevalência da infecção por *T. vaginalis* em mulheres é cerca de 10 vezes maior do que em homens, independentemente da localização geográfica, com a maioria das infecções persistentes também ocorrendo em mulheres (VAN DER POL, 2007; MUZNY, VAN GERWEN e KISSINGER, 2020; MABASO e ABBAI, 2021).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a tricomoníase humana se destaca das demais ISTs não virais, sendo assim, considerada a IST tratável mais recorrente em todo o mundo, superando infecções como a sífilis. Os casos de novas infecções por *Trichomonas* representam um número maior do que as de outras ISTs, também consideradas mais prevalentes, como infecções por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, estimadas em 105,7 milhões e 106,1 milhões, respectivamente (OMS, 2012; ROWLEY et al., 2019).

### **1.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS**

A tricomoníase é a infecção urogenital sexualmente transmissível não viral mais comum que afeta homens e mulheres, sendo mais prevalente nas mulheres, pois são casos de evolução crônica com intensa inflamação (vaginite). O canal vaginal é a estrutura que, principalmente, será afetada na infecção em mulheres, apresentando sinais e sintomas clínicos como corrimento vaginal, geralmente

descrito como espumoso e muitas vezes amarelo ou esverdeado, irritação vulvovaginal, edema ou eritema e disúria. A colite macular, popularmente conhecida como colo de útero com aspecto de morango, é um sinal clínico específico para esta infecção, sendo diagnosticada com maior confiabilidade apenas por colposcopia (FICHOROVA, 2009). Homens com tricomoníase podem não apresentar quaisquer sinais clínicos, dificultando até mesmo o seu diagnóstico, tornando-os carreadores de *T. vaginalis*. Entretanto, a uretra é o local de infecção mais comum, causando irritação uretral, secreção ou leve queimação após urinar ou ejaculação e inchaço da próstata, consequências da uretrite, epididimite e prostatite, podendo ocasionar função espermática reduzida e infertilidade (FICHOROVA, 2009; REIN, 2020).

Os humanos são os únicos hospedeiros de *T. vaginalis*, parasita que existe apenas na forma de trofozoíto, que usa proteínas de adesão para se ligar às células epiteliais escamosas. Enzimas solúveis e associadas à membrana com atividade de fosfolipase A causam lise de células nucleadas, resultando em microulcerações e hemorragias microscópicas da parede vaginal e exocérvice. Embora as respostas imunoinflamatórias humorais e mediadas por células sejam geradas, ocorrem infecções repetidas e persistentes, indicando imunidade não protetora (MEITES e WORKOWSKI, 2018).

A tricomoníase já foi associada a outras infecções sexualmente transmissíveis (KISSINGER 2015a; b), resultados adversos da gravidez, aumento do risco de aquisição e transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV), neoplasia cervical (KISSINGER, 2015; GLEHN et al. 2017), doença inflamatória pélvica e câncer de próstata (GLEHN et al. 2017). Na gravidez, a tricomoníase pode levar a complicações como parto prematuro, ruptura prematura de membranas placentárias (aborto espontâneo), baixo peso ao nascer (CHINEDUM et al. 2014; GLEHN et al. 2017; KISSINGER, 2015; SMITH et al., 2017; MUDAU et al. 2018) e morbidade e mortalidade neonatal (CHINEDUM et al. 2014). A tricomoníase também pode ser transmitida a bebês recém-nascidos durante o parto (CHINEDUM et al. 2014; KISSINGER 2015; AKBARI e MATINI 2017).

#### **1.4. DIAGNÓSTICO**

A modalidade diagnóstica primária para *T. vaginalis* tem sido tradicionalmente o exame microscópico de uma porção úmida de fluido vaginal, em busca de

tricomonas móveis (SCHWEBKE e BURGESS, 2004). Embora a montagem úmida seja barata e rápida, seu uso é limitado pela baixa sensibilidade, que varia de 44 a 68% em comparação com a cultura (HOBBS e SEÑA, 2013). Antes do advento dos NAATs (*Nucleic Acid Amplification Test*), a cultura era o padrão ouro para o diagnóstico de *T. vaginalis*, com uma sensibilidade de 81–94% (GARBER, 2005).

O meio de Diamond é o método de cultura tradicional usado para o isolamento de *T. vaginalis*. No entanto, a contaminação com bactérias vaginais é comum, dificultando esta técnica (GARBER, 2005). Sistemas de cultura, como o sistema InPouch® (BioMed Diagnostics, White City, OR), foram desenvolvidos para evitar a contaminação, colocando a amostra em uma bolsa de duas câmaras, permitindo a amostragem simultânea para montagem úmida e cultura, mantendo eficácia semelhante à mencionada anteriormente (BEAL et al., 1992).

Embora já existam testes de amplificação de ácido nucléico (NAATs) e testes de diagnóstico pontuais para homens e mulheres (MEITES et al., 2015; MUZNY et al., 2019), a maioria das infecções assintomáticas por *T. vaginalis* permanece não identificada e não tratada (MIELCZAREK e BLASZKOWSKA, 2016).

O ensaio Xpert® TV (Cepheid, Sunnyvale, CA) foi o primeiro teste de amplificação de NAATs aprovado pela FDA para uso em urina feminina, esfregaço endocervical e espécimes vaginais coletados por pacientes e médicos, bem como para urina masculina (SCHWEBKE et al., 2018). A sensibilidade e especificidade diagnóstica para o ensaio Xpert® TV variam de 99,5–100% e 99,4–99,9% para amostras genitais femininas e 97,2–99,9% para amostras de urina masculina (SCHWEBKE et al., 2018). Depois de coletado e colocado na plataforma de teste, o ensaio Xpert® TV produz resultados em 60–90 minutos, permitindo o diagnóstico e gerenciamento de ponto de atendimento (POC) (BADMAN et al., 2016).

Já o ensaio Seegene Allplex™ para diagnóstico de vulvovaginite apresentou um excelente desempenho no diagnóstico de vaginoses bacterianas e nas infecções por *Candida* spp. e *Candida albicans*, já para a tricomoníase os resultados foram bons, mas insuficientes como descrito em estudos. Além disso, os resultados demonstram maior sensibilidade em mulheres sintomáticas, sendo utilizada apenas uma amostra de esfregaço vaginal (VIEIRA-BAPTISTA et al., 2021).

O OSOM<sup>®</sup> Trichomonas Rapid Test (Sekisui, Framingham, MA) é um ensaio imunocromatográfico de detecção de antígeno qualitativo com um tempo de processamento entre 10-15 minutos (NATHAN et al., 2015). Este foi validado para o diagnóstico de *T. vaginalis* em mulheres a partir de espécimes vaginais, tendo uma sensibilidade de 83-92% e especificidade de 99% (NATHAN et al., 2015; SHEELE et al., 2019). Este teste não teve um bom desempenho na identificação de infecção por *T. vaginalis* na urina masculina, quando comparado com o Aptima<sup>®</sup> TV Assay (SHEELE et al., 2019), portanto, atualmente é recomendado apenas para mulheres (WORKOWSKI, 2015). Por não exigir nenhum equipamento altamente específico e ser de baixo custo, o teste OSOM<sup>®</sup> é atrativo no cenário de campanhas de teste de ISTs em locais com recursos reduzidos (GARRETT et al., 2018).

### 1.5. TRATAMENTO

O tratamento para a tricomoníase conta com apenas dois fármacos recomendados pelo FDA (*Food and Drug Administration*, EUA), sendo estes o metronidazol (MTZ) e o tinidazol (TNZ) (SECOR, 2012; KISSINGER, 2015; BOUCHEMAL et al., 2017). Ambos os fármacos são pertencentes à classe dos 5-nitroimidazóis, tendo o mesmo mecanismo de ação. Embora seja curável a infecção por *T. vaginalis* ainda pode ser altamente persistente e recorrente, ainda que a taxa de falha apareça em apenas 10% dos casos de uso da dose única de metronidazol. Ainda assim, seu tratamento costuma ser dificultado por causa dos efeitos colaterais da droga. Geralmente, estes efeitos incluem náuseas, vômitos, prisão de ventre, cólicas e seu gosto metálico. Outros efeitos adversos incluem neuropatia periférica, convulsões, fadiga, tontura, cefaléia e leucopenia (PEARLMAN et al., 1996; MILLER e NYIRJESY, 2011; SEÑA et al., 2014). Além destes transtornos, em certos casos, a alergia associada ao metronidazol pode causar urticária, edema facial e choque anafilático, também resultando na falha da terapia (MEHRIARDESTANI et al., 2017).

A primeira descrição de um caso em que houve uma falha no tratamento com MTZ em paciente infectada por *T. vaginalis* ocorreu em 1962, três anos após a introdução do fármaco no mercado (ROBINSON, 1962). A falha do tratamento pode ser devido à absorção insuficiente e/ou administração de metronidazol no local alvo, inativação do medicamento pela microbiota vaginal, atividade tricomonadídeos-dependente e re-infecção ou não adesão (MATINI et al., 2016; ALESSIO e

NYIRJESY, 2019). Mulheres que vivem com HIV podem necessitar de múltiplas doses do metronidazol, devido a mudanças na microbiota vaginal, interferência da imunidade pelo tratamento de dose única e interação de medicamentos antirretrovirais com metronidazol (KISSINGER e ADAMSKI, 2013). No caso dos homens, as infecções por *T. vaginalis* também estão associadas à prostatite crônica levando a cânceres de próstata agressivos, conforme observado a partir do aumento dos níveis de antígeno específico da próstata (SUITCLIFFE et al., 2006; LANGSTON et al., 2019).

Apesar da eficácia *in vitro*, o baixo sucesso terapêutico pode estar associado, provavelmente, à falha dos tratamentos em reagir aos parasitas extravaginais, como aqueles que residem na uretra e nas glândulas de Skene (NANDA et al., 2006; HELMS et al., 2008; MUZNY et al., 2013).

Os mecanismos de resistência de *T. vaginalis* ao metronidazol ainda não são bem compreendidos, mas a presença de cepas resistentes ao metronidazol ou a toda a família dos 5-nitroimidazóis é bastante comum, o que eventualmente expõe a falta de medicamentos disponíveis para tratar a infecção pelas tricomonas. Dada a densidade populacional que sofre com a infecção por *T. vaginalis* e a falta de medicamentos, há uma necessidade emergente de descobrir medicamentos seguros e eficazes para tratar a tricomoníase (MABASO et al., 2020; HASHEMI et al., 2021). A resistência clínica ao metronidazol é definida como falha na cura da infecção após dois cursos consecutivos de tratamento (SOOD et al., 2008; ALESSIO e NYIRJESY, 2019).

Diversos estudos têm destacado o potencial de produtos naturais (BALA e CHHONKER, 2018; HASHEMI et al., 2021) e de fontes microbianas como anti-tricomonais (DE BRUM VIEIRA et al., 2015; KING et al., 2019), como potenciais fármacos alternativos ao metronidazol. Foi desenvolvida uma plataforma de triagem de alto conteúdo baseada em imagens, no entanto, ela usa metodologias tecnológicas que ainda não estão amplamente disponíveis e que exigem rotulagem e manipulação adicionais de parasitas (KING et al., 2019). Assim, pouco progresso foi feito para traduzir a pesquisa anti-tricomonal em terapêuticas comercializadas e a ausência de uma plataforma padronizada de triagem de compostos é o obstáculo imediato para a descoberta de novos quimioterápicos. Com as buscas por novos quimioterápicos efetivos contra este parasito, foi elaborada uma nova plataforma de

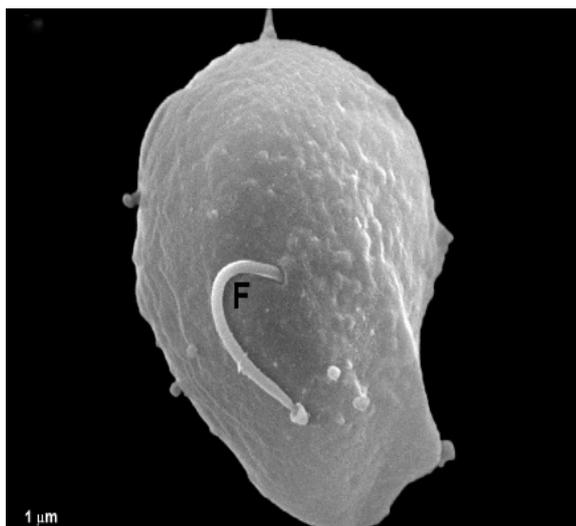
drogas anti-tricomonal, simples e eficaz que é econômica, escalonável e possui alto rendimento (LAM et al., 2021).

### 1.6. MORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA

As *Trichomonas* são protistas que em cultura axênica apresentam forma aproximada de pera (GRANGER et al., 2000). Em condições de cultivo normais, *T. vaginalis* apresenta quatro flagelos anteriores e um recorrente (Fig. 1), sendo os responsáveis pela movimentação da célula. No entanto, durante a infecção, quando em contato com a célula hospedeira, é notório que a morfologia adquira aspecto diferente, onde a célula assume conformação amebóide, o que aumenta sua área de adesão com a célula hospedeira (FIORI et al., 1999; PEREIRA-NEVES e BENCHIMOL, 2007).

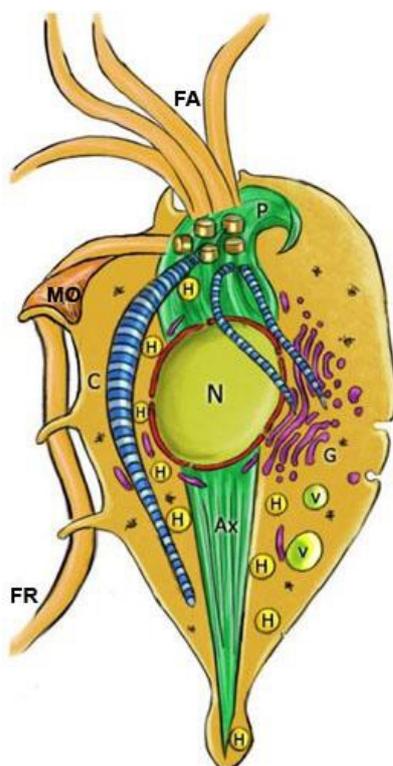
O ciclo de vida de *T. vaginalis* é simples, pois o trofozoíto é transmitido por via sexual e nenhuma forma de cisto é conhecida. O trofozoíto se divide por fissão binária e, em infecções naturais, dá origem a uma população no lúmen e nas superfícies mucosas do trato urogenital humano.

Quando se encontram em situações de estresse, como por exemplo durante tratamento com quimioterápicos, variações de temperatura ou quando estão em meio deficiente em nutrientes, internalizam seus flagelos adquirindo uma forma arredondada. Devido ao fato de não possuírem parede cística, são denominados pseudocistos (Fig. 2) ou, preferencialmente, formas endoflagelares, que são reversíveis quando a situação do meio de cultivo se torna novamente favorável, como estudado em *Tritrichomonas foetus* (GRANGER et al., 2000; PEREIRA-NEVES et al., 2003) e na ausência de ferro em *T. vaginalis* (DIAS-LOPES et al., 2017).



**Figura 2.** *Tritrichomonas foetus* observada durante o processo de internalização dos seus flagelos. Note que o último flagelo se encontra em processo de internalização. (Foto de M. Benchimol).

*Trichomonas vaginalis*, assim como as demais espécies de *Trichomonas*, apresenta diversos componentes intracelulares, comuns ou não a outras células eucarióticas (Fig. 3). Além dos quatro flagelos anteriores e um recorrente, que percorre a superfície celular formando uma membrana ondulante, o parasita também possui um núcleo, um complexo de Golgi bem desenvolvido, retículo endoplasmático liso e rugoso, dispostos em torno do núcleo (BENCHIMOL, 2001), mas não possuem mitocôndrias. Também apresentam organelas e estruturas incomuns a outros organismos eucariontes, como: (1) os hidrogenossomos, organela esférica com dupla membrana, que produz hidrogênio molecular e ATP, e estruturas do citoesqueleto, como (2) axóstilo, formado por microtúbulos em disposição longitudinal e que está envolvido na sustentação do parasito, (3) a pelta, presente na região anterior do parasito, (4) costa, estrutura em forma de bastonete, formada por bandas eletrólucidas e eletrondensas dispostas de forma alternada, além dos filamentos sigmóides e diversas estruturas associadas aos corpúsculos basais (BENCHIMOL et al., 2000; BENCHIMOL 2004).



**Figura 3.** Esquema geral demonstrando as principais organelas e estruturas do parasito. Ax, axóstilo; C, costa; FA, flagelos anteriores; FR, flagelo recorrente; G, Golgi; H, hidrogenossomos; MO, membrana ondulante; N, núcleo; P, pelta; V, vacúolos (Esquema de M. Benchimol).

### 1.6.1. Núcleo

Quando não estão realizando processo de divisão, os Tricomonádídeos apresentam um núcleo único localizado geralmente na região anterior da célula, apresentando diversos complexos de poros nucleares típicos ao longo do envoltório nuclear (BENCHIMOL et al., 1982; BENCHIMOL, 2004). O envoltório nuclear dos tricomonádídeos se assemelha ao de eucariotos superiores, estando a membrana nuclear mais externa em continuação com o retículo enquanto a membrana interna se encontra voltada para a matriz nuclear. O envoltório nuclear não se fragmenta durante a divisão celular desse protozoário, sendo assim, realiza um processo chamado de mitose fechada, com fuso extranuclear. A lâmina nuclear e as lamínas ainda não foram evidenciadas (BENCHIMOL, 2004).

### 1.6.2. Retículo Endoplasmático

Como ocorre em todas as células eucarióticas, em *T. vaginalis* o retículo endoplasmático (RE) é, comumente, visualizado ao redor do núcleo, formando a membrana externa do envelope nuclear (QUEIROZ et al., 1991; BENCHIMOL, 2004). O RE também é encontrado em outras regiões do citoplasma, em estreita associação com o axóstilo e próximo aos hidrogenossomos, podendo estar relacionado à formação das vesículas periféricas (BENCHIMOL e DE SOUZA, 1985; BENCHIMOL et al., 1996; BENCHIMOL et al., 2000; BENCHIMOL, 2008). Os ribossomas podem ser visualizados livres no citoplasma ou aderidos à membrana do retículo endoplasmático, formando o retículo endoplasmático rugoso (BENCHIMOL et al., 2001). Durante o tratamento com drogas e quando as tricomonas estão em processo de autofagia, o RE aumenta seu tamanho e ocorre a inclusão dos hidrogenossomos nos perfis de retículo caracterizando o processo clássico de autofagia (BENCHIMOL, 1999).

### 1.6.3. Hidrogenossomos

*T. vaginalis* diverge fortemente da maioria de outros protistas por ser amitocondrial, tendo um metabolismo anaeróbico e por hospedar esta organela incomum, o hidrogenossomo. Ela é responsável pelo metabolismo energético do parasita. Alguns autores consideram essa organela como uma variação das mitocôndrias que se adaptaram à vida anaeróbica (BIAGINI et al., 1997; EMBLEY et al., 2003), capaz de produzir hidrogênio molecular e ATP (LINDMARK e MÜLLER, 1973). Os hidrogenossomos podem ser encontrados em associação com os grânulos de glicogênio e estruturas do citoesqueleto, como o axóstilo e a costa (BENCHIMOL e DE SOUZA, 1983; BENCHIMOL et al., 1996; BENCHIMOL et al., 2000).

A associação dos hidrogenossomos com o retículo endoplasmático também já foi descrita, o que poderia indicar o fornecimento de lipídios para o crescimento dos hidrogenossomos (BENCHIMOL et al., 1996; BENCHIMOL et al., 2000). Entre as semelhanças com as mitocôndrias pode-se destacar, além da produção de ATP pela degradação do piruvato (LINDMARK e MÜLLER, 1973; MÜLLER, 1993; BUI et al., 1996), a presença da dupla membrana (BENCHIMOL et al., 1982), sugerindo uma mesma origem evolutiva. O piruvato e o malato são decompostos no

hidrogenossomo, mas derivam da glicólise que ocorre no citosol. A glicose, por sua vez, é obtida principalmente da quebra do glicogênio intracelular (WILSON et al., 2017) ou do glicogênio do canal vaginal. *T. vaginalis* secreta diversas glicosidases (HUFFMAN et al., 2015), incluindo, mais notavelmente,  $\beta$ -amilase (SMITH et al., 2016; ŠTÁFKOVÁ et al., 2018) que quebra o glicogênio em maltose. A maltose é posteriormente quebrada em glicose por outra glicosidase, seguida pela importação de glicose para a célula (HRDÝ e MÜLLER, 1995).

Outras semelhanças com as mitocôndrias incluem: a presença de translocases na membrana interna dos hidrogenossomos (SUTAK et al., 2004), o complexo translocase da membrana externa, sendo o principal responsável pela importação de proteínas para o hidrogenossomo (MAKKI et al., 2019), centros de ferro e enxofre (DOLEZAL et al., 2005) e a presença de cardiolipina, fosfolípido típico de membranas bacterianas e da membrana mitocondrial interna (DE ANDRADE ROSA et al., 2006). Entretanto, os hidrogenossomos e as mitocôndrias diferem em alguns aspectos, como a ausência de citocromos e a atividade da ATPase F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> (LLOYD et al., 1979; CLEMENS e JOHNSON, 2000; BENCHIMOL, 2008).

#### 1.6.4. Complexo de Golgi

Nas tricomonas, o complexo de Golgi corresponde ao aparelho parabasal, formado pelas cisternas do Golgi e os filamentos parabasais (BENCHIMOL, 2004). Este compartimento está localizado na região dorsal e à direita do núcleo. *T. vaginalis* possui um único Golgi, este é muito bem desenvolvido, diferente de vários outros protistas parasitas, podendo alcançar cerca de 5  $\mu$ m de comprimento, apresentando de 8 a 12 cisternas (BENCHIMOL et al., 2001). Experimentos utilizando a lectina WGA (*wheat germ agglutinin*) fluorescente evidenciaram a existência de resíduos de N-acetil-glicosamina nesta organela em *T. foetus* (BENCHIMOL e BERNARDINO, 2002). Ao contrário do que ocorre nas células de eucariotos superiores, onde há vesiculação durante a divisão celular, nos tricomonádídeos a organela permanece íntegra, apenas aumentando de tamanho por crescimento lateral e se dividindo em duas, em um processo denominado golgicinese (BENCHIMOL et al., 2001).

### **1.6.5. Citoesqueleto**

O citoesqueleto é uma rede complexa e dinâmica de filamentos proteicos interligados que estão presentes no citoplasma de todas as células eucarióticas, tendo diversas funções associadas a ele. Dentre os principais componentes do citoesqueleto dos tricomonadídeos destacam-se o complexo pelta-axostilar, formado por microtúbulos estáveis (RIBEIRO et al., 2000; BENCHIMOL, 2005), os flagelos, que variam de acordo com o gênero (HONIGBERG et al., 1971), os corpúsculos basais e seus filamentos associados, de onde emergem os flagelos e as demais estruturas relacionadas ao movimento do parasito (HONIGBERG et al., 1971), a costa, estrutura proteica estriada com a função de diminuir as tensões provocadas pelo batimento do flagelo recorrente (HONIGBERG et al., 1971; BENCHIMOL, 2005) e os filamentos parabasais que estão associados ao complexo de Golgi (HONIGBERG et al., 1971; BRUGEROLLE e VISCOGLIOSI, 1994).

#### **1.6.5.1. Filamentos Parabasais**

Os filamentos parabasais estão presentes em todos os tricomonadídeos e são encontrados próximos à face cis do complexo de Golgi (HONIGBERG e BRUGEROLLE, 1990). Em *T. vaginalis* estão presentes em número de três (LEE et al., 2009). São estruturas cuja composição é proteica e que apresentam periodicidade, havendo bandas claras e escuras alternadas, formando um aspecto de fibra estriada (VISCOGLIOSI e BRUGEROLLE, 1994). A associação destes filamentos com o complexo de Golgi forma o aparelho parabasal (HONIGBERG e BRUGEROLLE, 1990), onde se observou uma conexão estrutural entre a primeira cisterna do complexo de Golgi e esta estrutura periódica, sendo sugerido um papel funcional desses filamentos na migração do Golgi, junto com os corpúsculos basais e os flagelos durante a mitose fechada (BENCHIMOL et al., 2001).

#### **1.6.5.2. Complexo Pelta-Axóstilo**

O axóstilo de tricomonadídeos é uma estrutura axial, cuja composição se dá por microtúbulos, com função de sustentação e tem envolvimento no processo de divisão celular, quando promove a constrição nuclear na etapa de cariocinese. O complexo pelta-axóstilo é formado pela pelta e pelo axóstilo, que se apresentam como um folheto de microtúbulos justapostos, percorrendo o axóstilo, este sendo o

eixo longitudinal da célula, desde sua porção anterior até sua extremidade posterior, onde esta estrutura empurra a membrana plasmática, como uma forma projetada e afilada (HONIGBERG et al., 1971; BENCHIMOL, 2004). A pelta se encontra em uma posição mais anterior e contígua ao axóstilo, promovendo sustentação para as paredes do canal periflagelar, de onde emergem os flagelos (HONIGBERG et al., 1971; BENCHIMOL, 2004).

### 1.6.5.3. Costa

A costa é uma estrutura presente em todos os tricomonadídeos e, assim como os filamentos parabasais, é formada por proteínas que apresentam uma periodicidade com bandas claras e escuras, sendo maior e mais larga do que os filamentos parabasais (HONIGBERG et al., 1971; BENCHIMOL, 2004). Em uma análise proteômica de uma fração enriquecida da costa de *Tritrichomonas foetus* foram reveladas proteínas que exibem domínios não caracterizados e nenhuma função relacionada de acordo com a ontologia do gene, sugerindo que esta estrutura pode ser formada por uma nova classe de proteínas, que diferem daquelas previamente descritas em outros organismos (DE ANDRADE ROSA et al., 2017). Recentemente, foi elucidada a localização de uma proteína hipotética (ARM19800.1) desta estrutura em *T. foetus* a partir da produção de anticorpos policlonais que foram analisados por imunofluorescência e imunomarcação por microscopia eletrônica. Por ser a primeira proteína localizada na costa, foi designada como Costain 1 (BANDEIRA e DE SOUZA, 2021).

Esta estrutura é capaz de produzir dupla refração, sendo encontrada somente em tricomonadídeos que possuem membrana ondulante. Inclusive, é provável que sua função esteja relacionada com a diminuição do estresse mecânico provocado pelo batimento do flagelo recorrente. A costa é uma estrutura bastante peculiar e difere, em muitos aspectos, dos filamentos de citoesqueleto encontrados em músculos, cílios, flagelos ou outra estrutura que possua microtúbulos (AMOS et al., 1979).

Esta estrutura emerge da região anterior do protozoário, entre o corpo basal do flagelo recorrente e os corpos basais dos flagelos anteriores, estendendo-se até a região posterior da célula (HONIGBERG et al., 1971). A costa é formada por um conjunto complexo de filamentos finos bem organizados (BENCHIMOL e DE

SOUZA, 1983). Embora descrita como uma estrutura estável e sem mobilidade, a costa mostrou-se curvada em *T. foetus* quando os parasitas se transformam em pseudocistos (PEREIRA-NEVES et al., 2003; DE ANDRADE ROSA et al., 2015).

#### **1.6.5.4. Flagelos**

Os flagelos em tricomonas variam em número e tamanho em cada espécie. *T. foetus* tem três flagelos anteriores, enquanto *T. vaginalis* tem quatro, mais um recorrente que forma a membrana ondulante. Os axonemas desses flagelos são tipicamente eucarióticos com um arranjo de microtúbulos 9 + 2 e se originam de corpos basais localizados na região mais anterior do parasita (BENCHIMOL, 1992). Eles emergem da célula através do canal flagelar. O flagelo recorrente também emerge da região anterior, mas de uma abertura diferente. Ele se curva e se projeta em direção à região posterior, fazendo contato com o corpo celular, formando assim a membrana ondulante (WARTON e HONIGBERG, 1979; BENCHIMOL, 2004). Por técnicas convencionais de criofratura ou congelamento, os flagelos anteriores, mas não o flagelo recorrente, de *T. foetus* e *T. vaginalis*, mostram a presença de um arranjo especial de 9-12 partículas intramembranas formando rosetas (BENCHIMOL et al., 1981) e um arranjo de partículas formando um colar de proteínas, apenas na região de emergência dos flagelos (BENCHIMOL et al., 1992).

#### **1.6.6. Vacúolos e Lisossomos**

A capacidade de endocitose dos tricomonadídeos foi amplamente estudada com a utilização de diversos marcadores, como a peroxidase e diferentes proteínas conjugadas a ouro ou revestindo microesferas de poliestireno (albumina, lactoferrina, transferrina, lectinas) (BENCHIMOL et al., 1986, 1990; AFFONSO et al., 1994; 1997). No citoplasma das tricomonas também são encontradas várias vesículas de tamanhos variados que compõem o sistema endocítico da célula. *T. vaginalis* apresenta uma atividade endocítica muito mais intensa que em *T. foetus* (BENCHIMOL et al., 1990; AFFONSO et al., 1994). Geralmente, estas vesículas podem ser observadas constituindo o processo inicial da endocitose e, por este motivo, localizam-se logo abaixo da superfície celular ou mais dispersas no citoplasma (AFFONSO et al., 1997). Foi também observado que nanopartículas revestidas com quitosana, que exibem atividade anti-*T. vaginalis*, foram absorvidas

pelo parasita, causando drásticas alterações na superfície celular; o material foi endocitado, se fundindo com lisossomos e formando grandes vacúolos (MALLI et al., 2018).

Os lisossomos da tricomonas são considerados grandes organelas, que demonstram uma reação positiva para fosfatase ácida, como foi estudado após fracionamento celular, sendo confirmada a presença de hidrolases ácidas e neutras (QUEIROZ et al., 1991; BENCHIMOL, 1999, 2001). A digestão intracelular de diferentes materiais estranhos, como bactérias, ocorre nos lisossomos (FRANCIOLI et al., 1983; BENCHIMOL e DE SOUZA, 1995), bem como a digestão de organelas próprias, como ocorre com os hidrogenossomos durante a autofagia (BENCHIMOL, 1999).

#### **1.6.7. Membrana plasmática**

A organização da superfície celular nos tricomonadídeos foi inicialmente descrita com base nos estudos de microscopia eletrônica de transmissão convencional (SIMPSON e WHITE, 1964; HONIGBERG et al., 1971). No entanto, somente foi possível o avanço no estudo da ultraestrutura da membrana plasmática com o advento das técnicas de congelamento celular e criofatura (BENCHIMOL et al., 1981; 1982; 1992). Diversos carboidratos, incluindo ácido siálico, manose, galactose, N-acetilglicosamina e N-acetil-galactosamina foram detectados na superfície deste parasito, assim como nas membranas de compartimentos intracelulares (BENCHIMOL et al., 1981, 1982; BENCHIMOL e BERNARDINO, 2002).

### **1.7. PATOGENICIDADE DE *T. VAGINALIS***

#### **1.7.1. Co-infecção viral**

Existem diversas observações da infecção de *T. vaginalis* por um vírus de RNA de fita dupla (dsRNA), conhecido como *Trichomonasvirus* (TVV) (BENCHIMOL et al., 2002; ALDERETE et al., 2003; GOODMAN et al., 2011; FICHOROVA et al., 2017) e este pode interferir na virulência, patogenicidade e resistência aos medicamentos em *T. vaginalis* (HE et al., 2017; MARGARITA et al., 2019; GRAVES et al., 2019; GRAVES et al., 2019). Pensa-se que a prevalência de *T. vaginalis* infectados com TVV pode chegar a 50% (HE et al., 2017; MARGARITA et al., 2019).

De modo curioso, *Mycoplasma hominis* também foi identificado em mais de 80% dos isolados positivos para TVV que foram testados e eles podem formar uma relação endossimbiótica (MARGARITA et al., 2019).

Além disso, um imunógeno de superfície, P270, foi encontrado sendo regulado positivamente em isolados contendo TVV e acredita-se que o P270 contribua para que o parasita consiga escapar do sistema imunológico do hospedeiro. Acredita-se também que os isolados positivos para TVV tenham suscetibilidade aumentada ao metronidazol, no entanto, o mecanismo pelo qual essa suscetibilidade aumenta é desconhecido (GRAVES et al., 2019; GRAVES et al., 2019).

Em análises proteômicas de *T. vaginalis* infectada e não infectada, 50 proteínas foram encontradas alteradas entre os dois estados (HE et al., 2017). Em *T. vaginalis* infectado, proteínas ribossomais, isomerases e proteínas de adesão foram reguladas positivamente, enquanto as proteínas de choque térmico (Hsp), malato desidrogenase e fimbrina, proteína que entrecruza os filamentos de actina, foram reguladas negativamente (HE et al., 2017). As proteínas de adesão, Ap33-1 e AP51-3, foram relacionadas com a adesão de *T. vaginalis* às células hospedeiras e sua regulação positiva poderia levar a um aumento da infecciosidade em células positivas para TVV. Também foi observado que o TVV pode levar à regulação positiva de cisteína proteinases, enzimas-chave envolvidas na degradação de componentes da célula hospedeira e destruição da monocamada de células em cultivo (GRAVES et al., 2019).

### **1.7.2. Citoaderência de *T. vaginalis* e sua interação com células hospedeiras**

As tricomonas não penetram no epitélio vaginal, mas estabelecem uma relação com a superfície das células e por esta razão são consideradas parasitas extracelulares (RASMUSSEN et al., 1986; GONZÁLEZ-ROBLES et al. 1995). O processo de adesão às células hospedeiras é considerada uma característica importante na patogênese de diversos microrganismos. Ao se aderir às células epiteliais, *T. vaginalis* forma interdigitações e adquire uma forma amebóide, aumentando sua superfície de contato com a célula hospedeira (PEREIRA-NEVES e BENCHIMOL, 2007). Esta capacidade de aderência às células hospedeiras *in vitro* é

dependente da cepa, exibindo uma diferença de até 45 vezes na capacidade de aderência entre elas (LUSTIG et al., 2013). As tricomonas produzem enzimas proteolíticas, as mucinases, que digerem o muco que reveste o epitélio vaginal e permitem que os parasitas acessem as células do epitélio vaginal (ALDERETE e GARZA, 1988; LEHKER e SWEENEY, 1999). Além disso, *T. vaginalis* contribui para a patogênese quando citotoxinas solúveis, que desempenham um papel na virulência e na aderência, são liberadas na superfície da mucosa do hospedeiro (CROUCH e ALDERETE, 1999; MENDOZA-LOPEZ et al. 2000).

Estudos sobre os mecanismos moleculares de fixação de *T. vaginalis* aos tecidos da mucosa do hospedeiro sugerem que a aderência às células é multifacetada (tabela 2), com muitos fatores ainda a serem definidos (DO CAMPO et al., 2011; HIRT et al., 2011; HIRT, 2013; FICHOROVA et al., 2016; MERCER e JOHNSON, 2018).

**Tabela 2. Fatores que promovem a adesão de *T. vaginalis* às células hospedeiras**

<b>Tipo</b>	<b>Fator do parasita</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Referência</b>
Glicoconjugado de superfície	Lipofosfoglicano	Liga-se a Galectina-1 da célula hospedeira	OKUMURA, BAUM e JOHNSON, 2008.
Proteínas de superfície	TvBAP-1	Desconhecido	DE MIGUEL et al., 2010.
	Tv BAP-2	Desconhecido	DE MIGUEL et al., 2010.
Enzimas	TvPP1 $\gamma$	Desconhecido	MUÑOZ et al. 2012.
	TvLegu-1	Desconhecido	RENDON-GANDARILLA et al., 2013.
	TvROM1	Processa proteínas de superfície	RIESTRA et al., 2015.

Modulação da microbiota vaginal	Desconhecido	Inibe o crescimento de lactobacilos	FICHOROVA et al., 2013.
Vesículas extracelulares	Exossomos	Carregam proteínas e RNA para células hospedeiras	TWU et al., 2013.

**Fonte:** Adaptado de MERCER e JOHNSON, 2018.

A fixação do parasita ao epitélio urogenital de homens e mulheres permite o estabelecimento e manutenção da infecção, bem como a aquisição de nutrientes provenientes das células hospedeiras (DOCAMPO et al., 2011; LEITSCH, 2016).

Dentre os fatores ambientais, foi demonstrado que o ferro modula a virulência deste parasita por meio de seus efeitos na transcrição de uma grande variedade de genes (DE JESUS et al., 2007; HORVÁTHOVÁ et al., 2012; FERNÁNDEZ-MARTÍN et al., 2017). Consequentemente, o ferro mostrou regular os níveis de expressão, o tráfego de proteínas e a entrada de três fatores de transcrição, Myb1, Myb2 e Myb3, que de forma ordenada podem regular a expressão geral de um gene da enzima málica, conhecido como AP65-1 (ONG et al., 2007; HSU et al., 2009). Enquanto a expressão ectópica da enzima málica e seu papel na citoaderência do parasita permanecem controversos, a regulação da transcrição de AP65-1 forneceu uma importante ferramenta para estudar a transdução de sinal e o tráfego de proteínas em *T. vaginalis* (HSU et al., 2014; HSU et al., 2014; HSU et al., 2020).

O contato das tricomonas com células epiteliais vaginais aumenta consideravelmente a quantidade de adesinas expressas na superfície celular. Além disso, tem se verificado uma relação direta entre os níveis de aderência e a quantidade de adesinas ligadas às células epiteliais da vagina e do ureter, reforçando ainda mais associações específicas (GARCIA et al., 2003). Ademais, o ferro regula positivamente TvLEGU-1, uma cisteino proteinase caracterizada em *T. vaginalis* que é utilizada como fator de virulência durante o processo de infecção de células vaginais, sendo sua atividade proteolítica necessária para a adesão das tricomonas (RENDÓN-GANDARILLA et al., 2013).

Foi caracterizada uma proteína hipotética (TvAD1), presente na superfície do parasita, que desempenharia um papel integral na aderência ao hospedeiro. Sendo esta proteína mais abundante em parasitas com maior aderência do que em

parasitas de linhagem parental isogênica, foi observado que esta proteína se liga a *N*-acetilglicosamina, um açúcar que compõe glicosaminoglicanos de células hospedeiras (MOLGORA et al., 2021).

Diversos estudos *in vitro* relatam que a adesão, que é mediada por proteínas (adesinas) da superfície de *T. vaginalis* à célula hospedeira, é essencial para a continuidade da infecção e para a citopatogenicidade (ALDERETE e PEARLMAN, 1984; ALDERETE e GARZA, 1988; ALDERETE et al., 1995). Dentre elas, a adesina AP65, envolvida no processo de adesão, medeia este processo frente ao epitélio do hospedeiro influenciando a patogênese do parasita. Foi postulado que a AP65 pode ser considerada uma proteína candidata para o desenvolvimento de uma vacina funcional, responsável por induzir imunidade humoral e a celular, quando da infecção por *T. vaginalis* (ZHANG et al., 2021). Anteriormente, outra adesina importante neste processo, a AP33, também foi utilizada como antígeno com potencial para induzir imunidade, tanto humoral quanto celular (ZHANG et al., 2020).

Além disso, as tricomonas também são capazes de se ligar a substratos como laminina, fibronectina e colágeno, componentes conhecidos da matriz extracelular e da membrana basal (COSTA e SILVA-FILHO et al. 1988, BENCHIMOL et al., 1990, CROUCH e ALDERETE, 1999). A isoforma 1 da laminina é conhecida por ser um importante ligante para alguns protozoários parasitários, incluindo *T. vaginalis*. A laminina é uma glicoproteína, com peso molecular variando de 400 a 900 kDa, encontrada principalmente nas membranas basais formando uma rede proteica que organiza a formação da membrana extracelular (MEC) (YAO, 2017). Desempenham um papel essencial na miogênese e na sinaptogênese, também auxiliam na diferenciação celular, na migração, mas principalmente na adesão celular (ROGERS e NISHIMUNE, 2016). Uma molécula de superfície permite que *T. vaginalis* reconheça a laminina-1 e sua adesão a substratos revestidos com laminina seja facilitada (COSTA e SILVA-FILHO et al., 1988; ROGERS e NISHIMUNE, 2016).

A fagocitose realizada pelo parasita constitui outro mecanismo patogênico apresentado por *T. vaginalis* (HONIGBERG, 1990; ALDERETE et al. 1995; MIRHAGANI e WARTON, 1996). Alguns autores sugeriram que *T. vaginalis* adere às células do hospedeiro e as danifica por meio de um processo dependente do contato, exibindo um mecanismo citotóxico específico do parasita ao hospedeiro (GILBERT et al. 2000), o que provoca lise celular estritamente dependente do

contato (LUSTIG et al. 2013). Midlej e Benchimol (2010) complementam a descrição do processo de fagocitose do conteúdo celular por *T. vaginalis*, demonstrando que o parasita causa danos à membrana no contato com a célula hospedeira utilizando mecanismos citolíticos que incluem adesão, danos mecânicos, fagocitose e, posteriormente, a degradação nos lisossomos.

Mecanismos citolíticos que não dependem de contato também foram demonstrados e atribuídos a substâncias secretadas pelo parasita no meio de cultura (ARROYO e ALDERETE, 1989; FIORI et al. 1996; KUMMER et al. 2008). Na ausência deste contato direto, as células também podem transmitir mensagens biológicas de forma parácrina por meio de fatores secretados, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento secretados (TSUJI e KITAMURA, 2015). Sendo assim, os efeitos colaterais nas células não dependem apenas do contato direto célula a célula, mas também de suas ações parácrinas transitórias por meio da liberação de uma combinação de fatores tróficos (NAWAZ et al., 2016). Tem sido cada vez mais discutido que as células desenvolveram formas avançadas de comunicação baseada no contato direto e, também, por fatores parácrinos secretados. Estes incluem (1) vesículas extracelulares (VEs), denominadas como exossomos e microvesículas (MVs), secretadas por diversos tipos celulares e (2) pontes citoplasmáticas intercelulares de longo alcance conhecidas como nanotubos de tunelamento (TNTs) (NAWAZ e FATIMA, 2017).

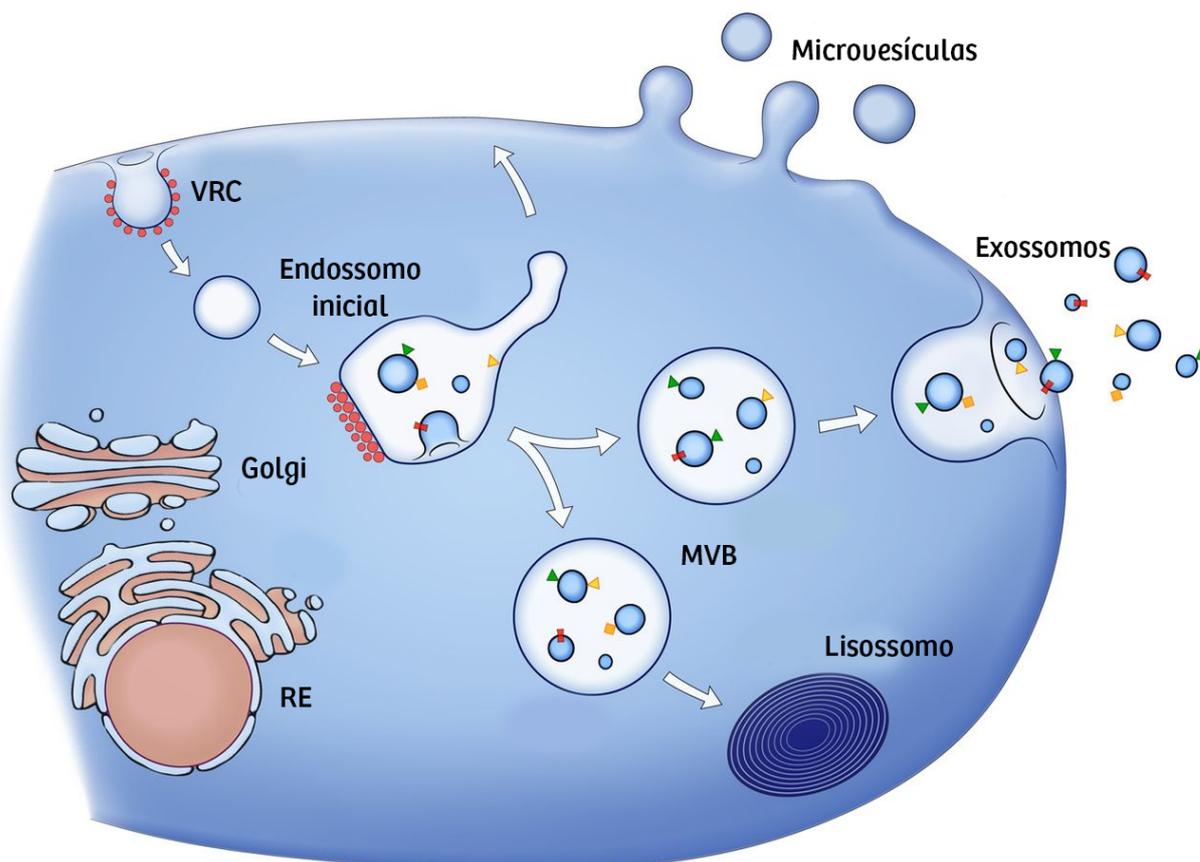
## 1.8. VESÍCULAS EXTRACELULARES

A “*International Society for Extracellular Vesicles*” (ISEV) define “vesículas extracelulares” (VEs) como um termo genérico para estruturas secretadas de forma espontânea pelas células, sendo elas delimitadas por uma bicamada lipídica e incapazes de se replicar (THÉRY et al., 2018). A liberação de VEs foi demonstrada em organismos bastante distintos, como *Archaea* e proteobactérias, plantas, fungos, protozoários e animais, onde já foram evidenciadas a capacidade de liberar uma ampla variedade de vesículas, por exemplo: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos, variando de aproximadamente 30 nm a alguns  $\mu\text{m}$  de tamanho, em seu ambiente extracelular (GILL et al., 2019; BOSE et al., 2021).

As vesículas extracelulares transmitem informações entre células, órgãos e até mesmo entre organismos, onde já foram detectadas em fluidos corporais, como sangue, urina, líquido cefalorraquidiano, leite materno e saliva, assim como em meios de cultura e foram associados a diferentes processos biológicos em células eucarióticas e procarióticas (RAIMONDO et al., 2011; RAPOSO e STOORVOGEL, 2013; KIM et al., 2015; YÁÑEZ-MÓ et al., 2015; THÉRY et al., 2018; MONGUIÓ-TORTAJADA et al., 2019).

Estes produtos celulares são uma forma de veicular macromoléculas biologicamente ativas, como proteínas e ácidos nucleicos, que, uma vez inseridos, atuam na fisiologia e na função das células hospedeiras. Geralmente, são agrupadas de acordo com diversos critérios, incluindo tamanho, densidade e localização dentro das células (Figura 4) (TKACH e THERY, 2016; THÉRY et al., 2018).

Basicamente, sua classificação em subgrupos se dá por (a) exossomo, que se origina dos corpos multivesiculares, um componente da via endocítica; (b) ectossomo, formado a partir de um processo de brotamento que ocorre na superfície celular; (c) vesículas liberadas da superfície celular após um processo de remendo e tamponamento de complexos ligante / receptor; (d) outros processos em que túbulos segregados pelo parasita originam estruturas semelhantes a exossomos (DE SOUZA e BARRIAS, 2020).



**Figura 4.** Representação esquemática da liberação de microvesículas e exossomos. Microvesículas são liberadas diretamente da membrana plasmática, enquanto os exossomos são representados por pequenas vesículas de tamanhos variados que são formadas a partir da fusão de MVBs com a membrana plasmática. MVB, corpos multivesiculares, do inglês *multivesicular bodies*; RE, retículo endoplasmático; VRC, vesícula revestida por clatrina (Adaptado de RAPOSO e STOOORVOGEL, 2013).

Diversas metodologias já foram recomendadas para isolar VEs (GREENING et al., 2015; KONOSHENKO et al., 2018). Entre os protocolos utilizados para isolar VEs estão ultracentrifugação, microfiltração e separação baseada em densidade (GREENING et al., 2015; THÉRY et al., 2006). Além disso, VEs podem ser caracterizados com base em seu conteúdo (THÉRY et al., 2018). O papel das vesículas tem sido associado à transmissão de sinais, regulação das atividades biológicas, condições compensatórias às mudanças no ambiente celular, entre outros (RAMIREZ et al., 2018).

A variação no modo de formação e liberação destas vesículas, dependentes de energia, levam a diferenças no tamanho, funções e composição. Por exemplo, os exossomos formados pela fusão de corpos multivesiculares com a membrana

plasmática medem cerca de 30-100 nm de diâmetro, enquanto as microvesículas que são formadas a partir de um brotamento da membrana plasmática, em um mecanismo dependente de  $\text{Ca}^{++}$ , possuem cerca de 100 nm a 1  $\mu\text{m}$  (DEOLINDO et al., 2013; EVANS-OSES et al., 2015; THÉRY et al., 2018).

Visto o papel fundamental exercido por estas vesículas na mediação das comunicações intercelulares, na entrega de uma carga e atuando como biomarcadores de diagnóstico, diversos grupos de pesquisa discutem futuras perspectivas para que vesículas extracelulares atuem como possíveis veículos de entrega de drogas, com base em sua faixa de tamanho e capacidade de transferir materiais biológicos para células hospedeiras (KIBRIA et al. 2018).

### **1.8.1. Exossomos e microvesículas em protozoários patogênicos**

Na literatura, o termo “exossomo” é, geralmente, usado para referenciar um grupo de VEs independentemente de sua procedência intracelular. Com o decorrer dos anos, técnicas em laboratório proporcionaram conhecimentos capazes de distinguir os vários tipos de VEs. A totalidade dos exossomos e suas inúmeras aplicações possíveis na medicina, tanto pelo diagnóstico quanto no tratamento de diversas patologias, têm atraído um importante interesse em pesquisa translacional (THERY et al., 2009; RAPOSO e STOORVOGEL, 2013; TKACH e THERY, 2016).

Estudos em células de mamíferos estabeleceram que exossomos empacotam importantes moléculas em sinalizações específicas utilizadas na comunicação intercelular (THÉRY et al., 1999), sendo esta necessária para manter as funções celulares e a homeostase dos tecidos em organismos multicelulares (RAPOSO e STOORVOGEL, 2013), na imunomodulação, onde desempenhariam funções na apresentação de antígenos, participação em metástase de diversas células tumorais, na entrega de receptores de superfície e transferência de RNA para células receptoras (VALADI et al., 2007; SCHOREY e BHATNAGAR, 2008; THÉRY et al., 2009; MATHIVANAN, JI e SIMPSON, 2010; BOBRIE et al., 2011; SILVERMAN e REINER, 2011; PANT et al., 2012).

A formação dos exossomos é distinta de outras vesículas extracelulares, ocorrendo quando a membrana endossômica invagina em corpos multivesiculares (MVBs) e, em seguida, se funde com a membrana plasmática, levando à secreção dos exossomos no meio extracelular (THERY et al., 2002). Esta nova via de

biogênese de vesículas extracelulares foi observada pela primeira vez na secreção de transferrina por reticulócitos (HARDING et al., 1983; PAN et al., 1985).

As microvesículas são importantes estruturas na comunicação célula-célula, homeostase tecidual e diferenciação celular, assim como no desenvolvimento e remodelação de órgãos (TKACH e THÉRY, 2016). A maquinaria envolvida no processo de liberação das MVs ainda está em uma fase precoce de compreensão. Estudos em células de mamíferos indicam que durante o processo de brotamento e liberação de MVs acontece um aumento da concentração de cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) citoplasmático e a perda da assimetria de fosfolipídios da membrana plasmática (VAN DER POL, 2010). O  $\text{Ca}^{++}$  intracelular elevado é necessário na biogênese das microvesículas, mas apesar do seu papel principal neste processo a partir da membrana plasmática, a fonte de mobilização de  $\text{Ca}^{++}$ , intra ou extracelular, que conduz à vesiculação da membrana plasmática, permanece indefinida (TAYLOR et al., 2017). Os detalhes da formação de microvesículas precisam ser elucidados, mas até agora, a pesquisa sugere que o brotamento envolve os complexos da via endocítica necessários para a maquinaria de transporte (ESCRT) e tem semelhanças com o brotamento de vírions do HIV (MURATORI et al., 2009; XU et al., 2018).

Estas vesículas extracelulares, como um transportador de transporte natural e eficiente, podem manter características funcionais semelhantes às suas células parentais (BUI et al., 2018; WU et al., 2020).

Microvesículas e exossomos desempenham papel em vários processos biológicos, tanto patológicos quanto fisiológicos. Eles já foram identificados em muitos tipos de materiais biológicos, incluindo saliva, urina, plasma, leite materno e líquido amniótico (ADMYRE et al., 2007; KELLER et al., 2011; LOOZE et al., 2009; MOON et al., 2011). A morfologia destas vesículas é fundamentalmente esférica, medindo entre 30 a 100 nm e a ultracentrifugação a 100.000 x g, ou mais, é utilizada para sua sedimentação (JOHNSTONE et al., 1987). Gradientes de sacarose podem ser usados para purificação dada sua densidade específica no meio (1,13-1,19 g/ml) (RAPOSO et al., 1996).

O conteúdo intraluminal envolvido nestas vesículas é complexo, como, por exemplo, Rab GTPases ou proteínas incluídas no estímulo de formação dos corpos multivesiculares (Alix, Tsg101) (THÉRY et al., 2009; TAYLOR e GERCEL-TAYLOR,

2011; RAPOSO e STLOORVOGEL, 2013). Além disso, no espaço intraluminal dos exossomos existem diversas categorias de proteínas que estão constantemente conservadas: proteínas de choque térmico (HSP60, HSP70, HSP90), proteínas com atividade de adesão (tetraspaninas, CD81, CD63, CD37), anexinas (I, II, V, VI), proteínas do citoesqueleto (actina, tubulina), enzimas metabólicas e proteínas com atividade translacional (fatores de alongamento) ou de sinalização (SCHOREY e BHATNAGAR, 2008; SIMPSON et al., 2008; THERY et al., 2009; SILVERMAN et al., 2010; HASSANI et al., 2011; TAYLOR e GERCEL-TAYLOR, 2011; YANG e ROBBINS, 2011; RAPOSO e STLOORVOGEL, 2013; ATAYDE et al., 2015).

A carga de RNAs presente nestas vesículas extracelulares incluem vários biotipos que representam uma porção selecionada do conteúdo de RNA da célula de origem, com uma forte tendência para pequenos RNAs não codificantes, ainda que mRNA fragmentado e intacto, RNA ribossômico (rRNA) e moléculas de RNA não codificante longo (lncRNA) podem ser encontradas (O'BRIEN et al., 2020).

#### **1.8.1.1. Exossomos e microvesículas em *Trichomonas vaginalis***

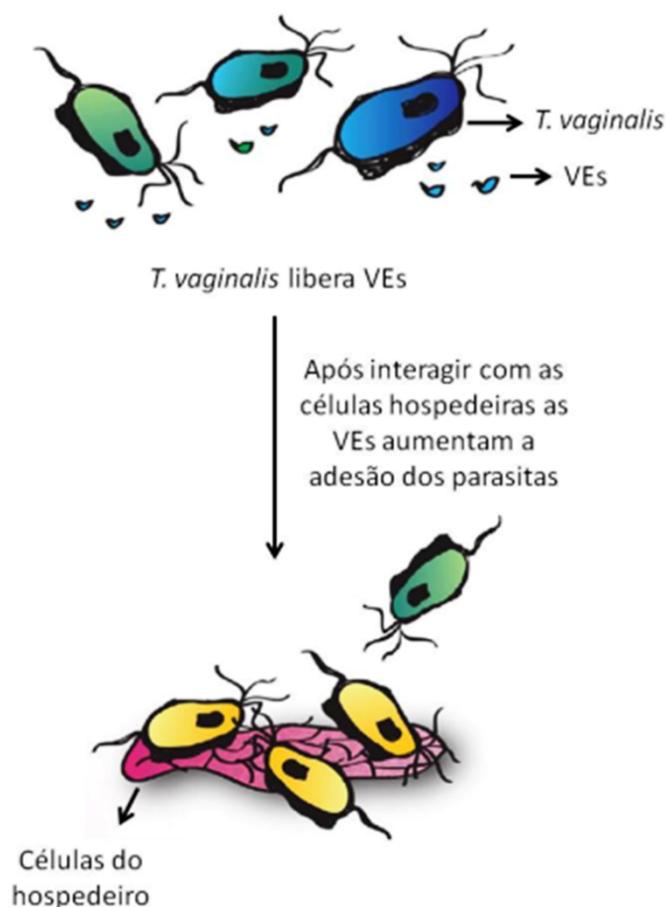
*T. vaginalis* libera VEs que desempenham um papel na interação parasita: parasita e nas interações com células hospedeiras (TWU et al., 2013; NIEVAS et al., 2018). Essas vesículas foram inicialmente caracterizadas como exossomos, com base na descrição da ultraestrutura e análise proteômica (TWU et al., 2013). Microvesículas e outras vesículas maiores foram relatadas como sendo produzidas por *T. vaginalis* e aumentadas como resultado de estímulos fisiológicos específicos (NIEVAS et al., 2018). As VEs de *T. vaginalis* podem alterar as interações das células do hospedeiro e induzir respostas imunes do hospedeiro (TWU et al., 2013; OLMOS-ORTIZ et al., 2017). VEs aumentam a citoaderência do parasita de uma maneira dependente da cepa e modulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 de células ectocervicais humanas, potencialmente facilitando a infecção (TWU et al., 2013).

Exossomos secretados por *T. vaginalis* demonstram importante papel imunomodulador no perfil de citocinas induzidas pelo parasita, na expressão de interleucina-10 (IL-10), IL-6 e TNF- $\alpha$  (OLMOS-ORTIZ et al., 2017). Em modelo murino, o pré-tratamento com exossomos isolados deste parasito, demonstrou aumento significativo na produção de IL-10, citocina anti-inflamatória, e uma

diminuição na produção de IL-17, assim como também diminuição de IL-6 e IL-13 ao longo dos períodos de infecção, promovendo a diminuição do processo inflamatório nos camundongos infectados (OLMOS-ORTIZ et al., 2017).

Estas microvesículas liberadas por *T. vaginalis* contêm RNA, proteínas exossômicas conservadas e proteínas específicas de parasitas (TWU et al., 2013). Foi descrito que exossomos de *T. vaginalis* são capazes de distribuir seu conteúdo para as células hospedeiras, modulando a resposta imune dessas células. Também foi descrito que os exossomos de cepas muito aderentes têm potencial de aumentar os níveis de aderência em cepas pouco aderentes. Em contrapartida, exossomos de cepas pouco aderentes não demonstram efeitos significativos na adesão do parasita às células hospedeiras (Fig. 4) (TWU et al., 2013).

A carga de RNA de vesículas de *T. vaginalis* é rapidamente internalizada por células humanas por meio de endocitose dependente de *lipid rafts*. Essa carga é predominantemente composta de pequenos RNAs derivados de tRNA (tsRNAs), uma classe considerada emergente de pequenos RNAs reguladores. A função destes RNAs reguladores na alteração das respostas celulares do hospedeiro requer estudos mais aprofundados, sugerindo um novo modo de comunicação parasita: célula hospedeira (ARTUYANTS et al., 2020).



**Figura 5.** O papel das vesículas extracelulares de *T. vaginalis*. O exossomos secretados pelo parasita interagem com as células hospedeiras e aumentam a adesão destes protozoários nestas células (Adaptado de TWU et al., 2013).

Foi também demonstrado que a interação e citotoxicidade em células hospedeiras mediadas por *T. vaginalis* é um processo multifatorial, incluindo a participação de vesículas secretadas pelos parasitas, bem como suas proteínas de superfície, tanto secretadas quanto efetoras (MERCER e JOHNSON, 2018).

Nas análises de componentes envolvidos na internalização de VEs e o mecanismo envolvido em sua captação foi mostrado que estas vesículas de *T. vaginalis* não só são capazes de entregar seu conteúdo solúvel, mas também de transferir lipídios quando a membrana dos exossomos se funde com a membrana das células hospedeiras (RAI e JOHNSON, 2019). Os mecanismos gerais que conduzem a captação de vesículas e a entrega de carga ainda não estão completamente caracterizados. A interação de uma carga específica de 4- $\alpha$ -glucanotransferase com sulfato de heparano, na superfície da célula hospedeira,

facilita a internalização das vesículas por meio de um processo endocítico independente de clatrina (RAI e JOHNSON, 2019). Logo, moléculas de sulfato de heparano em células hospedeiras atuam como receptores na primeira etapa de internalização destas vesículas (RAI e JOHNSON, 2019).

### **1.8.2. Nanotubos de tunelamento**

Os nanotubos de tunelamento (TNTs) são extensões citoplasmáticas transitórias contendo filamentos de actina, que se mantêm estendidas entre as células na forma de canais nanotubulares abertos (50–200 nm) (RUSTOM et al., 2004). Assim como as VEs, os TNTs também representam subtipos e estruturas morfológicas heterogêneas (AUSTEFJORD et al., 2014; BENARD et al., 2015). No entanto, a biossíntese de TNTs difere de VEs e é atribuída à polimerização de F-actina (GUNGOR-ORDUERI et al., 2015; OSTEIKOETXEA-MOLNAR et al., 2016). As vias regulatórias da formação de TNTs e do tráfego endossomal estão sobrepostas, ambas envolvendo componentes que regulam o transporte vesicular do complexo de Golgi para a membrana plasmática (KIMURA et al., 2013; SCHILLER et al., 2013; MARTIN-URDIROZ et al., 2016).

Tanto as VEs quanto os TNTs podem facilitar a comunicação de longo alcance entre as células. As vesículas transportam material biológico de forma parácrina, de forma que o conteúdo secretado de uma célula seja transportado para outra célula, enquanto os TNTs transportam material biológico através de pontes citoplasmáticas, entre células localizadas a longa distância (ONFELT et al., 2006; GURKE et al., 2008; WANG e GERDES, 2012; FYKERUD et al., 2016). Portanto, os TNTs servem como uma forma única de comunicação rápida entre células de longa distância na forma de condutos celulares diretos e, portanto, são considerados distintos de outros mediadores da comunicação célula-célula ou fatores secretados parácrinos (FREI et al., 2015).

Foram publicados dados de que diversos tipos celulares apresentam protrusões de membrana, recebendo nomes distintos, como citonemas, protrusões de membrana fina, extensões de membrana, protrusões semelhantes a TNT e pontes celulares, filopódios especializados, filopódios de sinalização e nanotubos de tunelamento (YAMASHITA et al., 2018). Posto isso, propuseram que estas protuberâncias desempenhariam algum papel em um novo mecanismo de

comunicação intercelular direta. Em relação aos protozoários parasitas, Szempruch et al., (2016) demonstraram que os nanotubos membranosos são formados a partir da membrana flagelar na região posterior de *Trypanosoma brucei* e que, posteriormente, se desassociam em VEs livres.

Em *T. foetus* também foi demonstrada a presença destas estruturas, atingindo até 4  $\mu\text{m}$  de comprimento. Dentre as observações neste tricomonadídeo, notou-se que estas pontes também realizam conexões diretas entre as células em cultura ou terminam livremente. As estruturas nanotubulares também podem ser liberadas dos flagelos para o meio extracelular (BENCHIMOL et al., 2021).

## 2. JUSTIFICATIVA

*Trichomonas vaginalis* é um protozoário extracelular e responsável por causar a tricomoníase, infecção sexualmente transmissível não-viral mais prevalente em todo o mundo. A tricomoníase já foi associada a diversos problemas de saúde, como transtornos gestacionais e ao aumento na transmissão do HIV, tornando a infecção por este parasita um problema de saúde pública. Existem diversos relatos na literatura abordando a importância do contato célula-célula para o sucesso da infecção pelas tricomonas, e hoje já se sabe que este patógeno secreta vesículas extracelulares que medeiam sua interação com as células hospedeiras, de forma que transmitem diversas macromoléculas, como fatores de virulência, que medeiam o processo infeccioso podendo manipular as respostas imunológicas por meio de mudanças transcricionais, tanto na infectividade de células *in vitro* e *in vivo*.

Além de contribuir na patogenicidade durante a infecção, vesículas extracelulares também apresentam potencial importante na pesquisa translacional devido à sua aplicação, principalmente, para terapia e vacinação, pois induzem imunidade eficiente para possíveis vacinas, e como reservatórios de possíveis biomarcadores que fornecem novas abordagens no diagnóstico para infecções parasitárias.

Os estudos que estão concentrados em analisar as vesículas extracelulares secretadas por *T. vaginalis* ainda são iniciais, mas de suma importância no campo das Pesquisa Translacional, visto que estas constituem uma nova forma de transferência de sinais entre células. Também foi observado em outros tricomonadídeos a projeção de nanotubos de tunelamento, algo que até a data não foi descrito em *T. vaginalis*. Estas estruturas já foram relacionadas também com a patogênese de outros protozoários patogênicos. Assim, torna-se crucial o estudo morfológico das microvesículas secretadas pelo parasita, bem como dos nanotubos de tunelamento para que se possa entender melhor o seu envolvimento no processo de interações com células hospedeiras.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avançar no entendimento da biologia celular dos processos secretórios de *Trichomonas vaginalis* e de sua interação com células de mamífero *in vitro*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Induzir a produção de microvesículas e nanotubos de tunelamento por cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e ionóforo de cálcio;
- Isolar microvesículas e caracterizar sua morfologia por espalhamento dinâmico de luz e contrastação negativa em microscopia eletrônica de transmissão;
- Verificar por microscopia eletrônica de varredura os aspectos gerais e estereológicos das células induzidas a secretar microvesículas;
- Analisar por microscopia de alta resolução a presença de microvesículas e nanotubos durante a interação de *T. vaginalis* com células vaginais nas condições indicadas no tópico anterior.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Cultivos celulares**

#### **4.1.1. Cultivo *in vitro* de *T. vaginalis***

As cepas JT e 347 de *T. vaginalis* utilizadas no estudo foram cultivadas em tubos cônicos de 15 mL com meio Trypticase Yeast Extract Maltose (TYM) (Diamond, 1957), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) inativado a 60°C e mantidas à 37°C por um período de 36h, o que corresponde à fase logarítmica de crescimento. O meio TYM é composto por: 22 mg/ml de triptona, 11 mg/mL de extrato de levedura, 5,6 mg/mL de maltose, 1 mg/mL de L-cisteína, 0,2 mg/mL de ácido ascórbico, 0,9 mg/mL de fosfato de potássio monobásico e 0,9 mg/mL de fosfato de potássio dibásico. Após serem adicionados os componentes citados a quantidade desejada de água Mili-Q, o pH foi ajustado para 6,2 e o meio autoclavado a 120°C por 20 minutos.

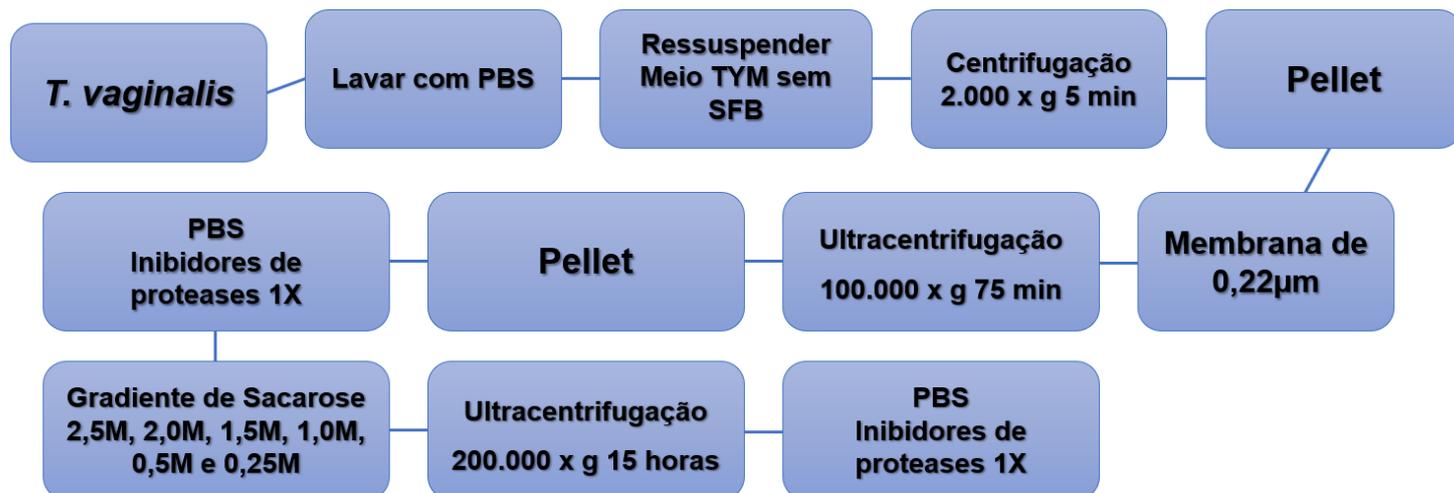
#### **4.1.2. Cultivo *in vitro* da Linhagem Celular Humana HMVII**

As células epiteliais vaginais HMVII (BCRJ 0316) obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco), suplementadas com 10% de SFB (Gibco) re-inativado pelo calor por 1h a 60°C, penicilina 100 UI / mL e estreptomicina 100 µg / mL, incubadas à 37°C em uma atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. O subcultivo foi realizado a cada 48h, utilizando garrafas plásticas de 25 cm<sup>2</sup>. Ao atingirem semi-confluência, as células foram dissociadas pela ação enzimática da tripsina-EDTA 0,05% (Gibco) por no máximo 5 minutos a 37°C e, após este tempo, adiciona-se a mesma quantidade de SFB para bloquear a atividade da tripsina. Para a realização dos experimentos, as células em suspensão foram contadas em câmara de Neubauer, semeadas em placas de 24 poços, cobertos com lamínulas de vidro, em uma densidade de 4 x 10<sup>3</sup> células/poço e suplementadas com 10% de SFB.

## 4.2. Secreção e obtenção de microvesículas secretadas por *T. vaginalis*

### 4.2.1. Microvesículas secretadas de modo constitutivo

As células foram cultivadas como descrito no tópico 4.1.1 em um volume de 2 litros e uma densidade de  $1 \times 10^6$  parasitas/mL, lavados 3x com PBS pH 7,2 a 37°C e ressuspensos em meio TYM sem soro por 4 horas, após as quais os parasitas foram removidos por centrifugação a 2.000 x g durante 5 minutos, utilizando a centrífuga MPW-315R e o rotor 11.457 (MPW *Instruments*, Polônia). O meio isento de células foi filtrado em uma membrana de 0,22µm (Merck, Alemanha) para remoção de restos celulares e as vesículas foram sedimentadas por ultracentrifugação durante 75 minutos a 100.000g utilizando a ultracentrífuga Beckman modelo Optima L-80 XP com o rotor 70Ti (Beckman Coulter, USA) à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e a amostra ressuspensa em PBS pH 7.2 a 4°C e centrifugada na mesma condição mencionada na etapa anterior. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensa em 300 µL de PBS pH 7.2 a 4°C contendo um coquetel de inibidores de proteases 1X (P2714, Sigma-Aldrich, EUA). Para proceder com o gradiente de sacarose, o *pellet* obtido deste processamento foi misturado a 6mL de sacarose 2,5M (Merck, Alemanha) em tampão Hepes 20mM/NaOH pH 7.2. O material homogeneizado é colocado no fundo do tubo para purificação das vesículas em diferentes concentrações de sacarose, sendo adicionados 6mL de cada concentração de sacarose, na ordem: 2,0M, 1,5M, 1,0M, 0,5M e 0,25M. O gradiente foi ultracentrifugado a 200.000 x g por 15 horas à 4°C na ultracentrífuga Beckman modelo Optima L-80 XP com o rotor SW28 (Beckman Coulter, EUA). Em seguida, foram coletadas frações de 2 mL, sendo ressuspensas em PBS à 4°C com inibidor de proteases 1X (P2714, Sigma-Aldrich, EUA).



**Figura 6.** Fluxograma do fracionamento celular das *T. vaginalis* para obtenção das frações enriquecidas em microvesículas utilizando um protocolo adaptado por M. Benchimol.

#### 4.2.2. Indução da secreção de vesículas extracelulares

As células foram cultivadas na concentração  $1 \times 10^6$  células/mL, assim como descrito no tópico 4.1, lavadas 3x com PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) a 37°C, pH 7,2, e ressuspensas em meio TYM, sem suplementação de SFB por 4h. Após este tempo, as células foram tratadas com 1mM de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) ou com 1mM  $\text{CaCl}_2$  + 4,5µM ionóforo de cálcio. Os parasitas foram incubados nos tempos de 5, 10 e 20 minutos à 37°C. As células-controle foram incubadas na ausência de  $\text{CaCl}_2$  e ionóforo de cálcio. Após o tempo determinado para os experimentos, as células foram lavadas 3x com PBS pH 7,2 a 37°C por 2.000 x g durante 5 minutos e processadas para microscopia eletrônica de varredura e transmissão e de varredura de íons Hélio.

#### 4.2.3. Coleta do sobrenadante das culturas em tratamento com $\text{CaCl}_2$ e ionóforo de cálcio

Os sobrenadantes das culturas tratadas com  $\text{CaCl}_2$  ou  $\text{CaCl}_2$  e ionóforo de cálcio foram reservados para análises posteriores. Deste modo, após o material ser

centrifugado 2x a 4.000xg durante 30 minutos, o *pellet* contendo *debris* celulares foi descartado e o sobrenadante contendo as MVs foi ultracentrifugado a 100.000xg durante 90 minutos em temperatura de 4°C (Beckman Coulter, USA). Após o descarte do sobrenadante as vesículas foram ressuspensas em PBS pH 7,2 a 4°C.

### **4.3. Ensaios de interação**

#### **4.3.1. Experimentos de co-incubação**

As células HMVII foram cultivadas em placas de 24 poços contendo meio RPMI suplementado com 10% de SFB até atingirem semi-confluência. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e o experimentos realizados na proporção de 10:1 (parasito: célula hospedeira). A proporção dos volumes de meio de cultura foi de 25% de meio TYM e 75% de meio RPMI, com o objetivo de preservar as células epiteliais. Em seguida, foram incubados por diferentes tempos a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em meio de interação sem suplementação de SFB. Como controle, os parasitos não foram adicionados às culturas de células epiteliais. Depois dos períodos de interação, as células foram fixadas e processadas para microscopia eletrônica de varredura e transmissão e varredura de alta resolução com íons Hélio, conforme descrito, respectivamente, nos itens 4.6, 4.8 e 4.7.

### **4.4. Espalhamento Dinâmico de Luz**

Nestas análises, a determinação da distribuição de tamanho das vesículas foi baseada na taxa de movimentação browniana de nanopartículas neste sistema de dispersão de luz. Para isso, foi utilizado o equipamento NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY, EUA), capaz de verificar a distribuição do tamanho das nanopartículas entre 10nm e 2µm. Alíquotas de 10 µL de cada amostra enriquecida com vesículas foram diluídas 1:1000 em PBS pH 7,2 à temperatura de 25°C filtrado em membrana de 0,22 µm, antes de serem lidas no equipamento.

#### **4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

No processamento de rotina para microscopia eletrônica de varredura, as amostras coletadas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (*Electron Microscopy Sciences*, EUA) em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2. Em seguida, foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) 1% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 e ferricianeto de potássio 0,8% por 30 minutos e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% e super seco, este último 3x) (15 minutos em cada concentração). As amostras foram secas pelo método do ponto crítico (Leica CPD 300, Alemanha), montadas em suportes metálicos (*stubs*) e revestidas com 10 nm de ouro ou 4 nm de platina, dependendo do MEV que será utilizado durante as análises, sendo utilizados o Quanta 250 (FEI, Holanda) operando em 20 kV ou Auriga 40 (Zeiss, Alemanha), operando em 2 kV.

#### **4.6. Microscopia de Varredura de alta resolução com íons Hélio**

As amostras foram coletadas e processadas como descrito no tópico 4.6 até a etapa de secagem pelo método do ponto crítico. Após esta, as lamínulas contendo as amostras foram montadas em suportes metálicos (*stubs*) sem revestimento para análises em alta resolução no microscópio de íons Hélio Orion NanoFab (Zeiss, Holanda) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

#### **4.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

##### **4.7.1. Contrastação negativa**

As três frações obtidas após a centrifugação em gradiente de sacarose são coletadas e lavadas em PBS utilizando ultracentrifugação a 200.000 x g por 1h para retirar o excesso da solução de sacarose. Após a lavagem, estas frações são recuperadas em PBS e depositadas (1-3 $\mu$ L) em grades de cobre de 300 mesh (*Electron Microscopy Sciences*, EUA), cobertas com Formvar (Sigma-Aldrich, EUA),

onde permanecem sobre a grade por um tempo aproximado de 5 minutos. Em seguida, o excesso de amostra é removido com o auxílio de papel filtro. A contrastação é realizada através da deposição de 0,5% de acetato de uranila ou 3% de aurotioglicose (5  $\mu$ L) por 1 minuto e o excesso de contrastante também é removido com papel filtro. As amostras são observadas em um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai Spirit (FEI Company, Holanda) com aceleração de 120 kV equipado com uma câmera de 2K (Veleta, Olympus, Alemanha).

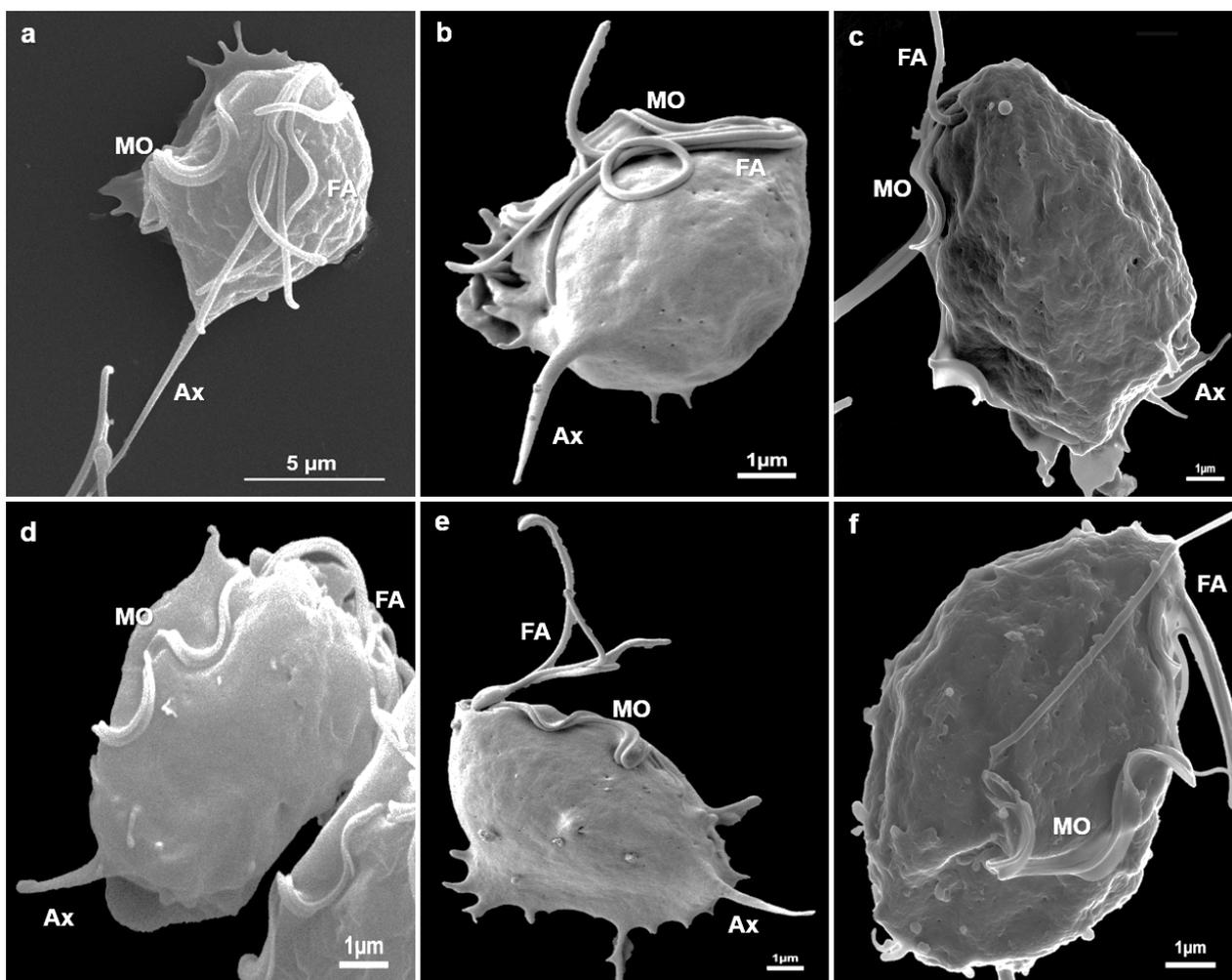
#### **4.7.2. Processamento de rotina para MET**

Após feitos os ensaios experimentais como descrito em tópicos anteriores, as amostras foram lavadas em PBS, pH 7.2 e, posteriormente, fixadas em uma solução contendo glutaraldeído 2.5% (*Electron Microscopy Sciences*, EUA), em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2. As células foram lavadas em PBS pH 7,2 e pós-fixadas em solução contendo tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 e ferricianeto de potássio 0,8% por 30 min, na ausência de luz. Feita a etapa de pós-fixação, as amostras foram, novamente, lavadas 3x em PBS pH 7,2. Em seguida, as células foram desidratadas em solução de acetona (Merck, Alemanha) em crescentes concentrações (50%, 70%, 90%, 100%, sendo realizadas 3 trocas com acetona do frasco original) (15 minutos em cada concentração). As células foram infiltradas por uma resina epóxi (PolyBed 812, *Electron Microscopy Sciences*, EUA) de forma gradual em misturas de acetona:epon (2:1 por 6 h, 1:1 e 1:2 por 8 h e resina pura por 12 h). Posteriormente, o material foi colocado em moldes e levado para estufa a 60°C por 72h, para que a resina polimerize. Depois de polimerizados, estes blocos foram seccionados na espessura de 70 nm com uma faca de diamante (Drukker, Reino Unido) no ultramicrotomo Leica (Alemanha) ULTRACUT UC6 ou 7 e coletados em grades de cobre de 300 mesh. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 5% em água por 40 minutos e em citrato de chumbo por 3 minutos e visualizados ao microscópio eletrônico de transmissão Tecnai Spirit (FEI, Holanda) com aceleração de 120 kV.

## 5. RESULTADOS

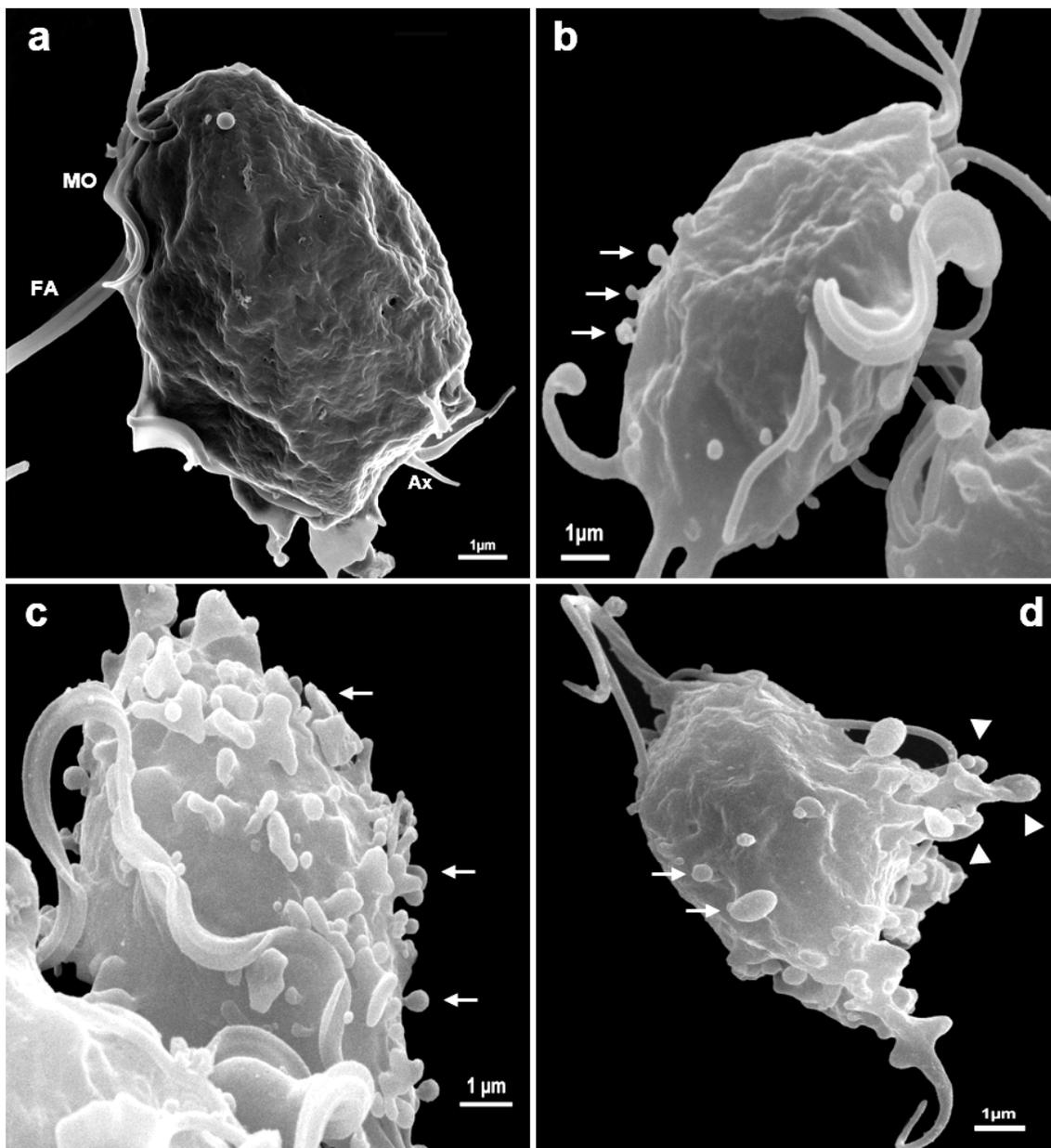
### 5.1. Análise topográfica de *T. vaginalis* em processo de secreção de MVs estimulado por $\text{CaCl}_2$ e ionóforo de cálcio

A superfície de *T. vaginalis* tem sido estudada com a utilização da microscopia eletrônica de varredura. A maioria dos parasitas controle cultivados por 36 hs apresenta a típica morfologia piriforme, com seus flagelos externalizados e axóstilo também evidente (Figs. 7). A superfície dessas células é relativamente lisa, ainda que apresentando áreas de projeções e depressões.



**Figura 7.** Micrografias de células de *T. vaginalis* controle, cepa JT (Figs. a-c) e cepa 347 (Figs. d-f) exibindo seus flagelos, axóstilo e membrana ondulante. As imagens foram obtidas por diferentes microscópios de varredura: Quanta 250 (Figs. a, b), Auriga 40 (Figs. b, e) e Orion (Figs. c, f). Ax, axóstilo; FA, flagelos anteriores; MO, membrana ondulante.

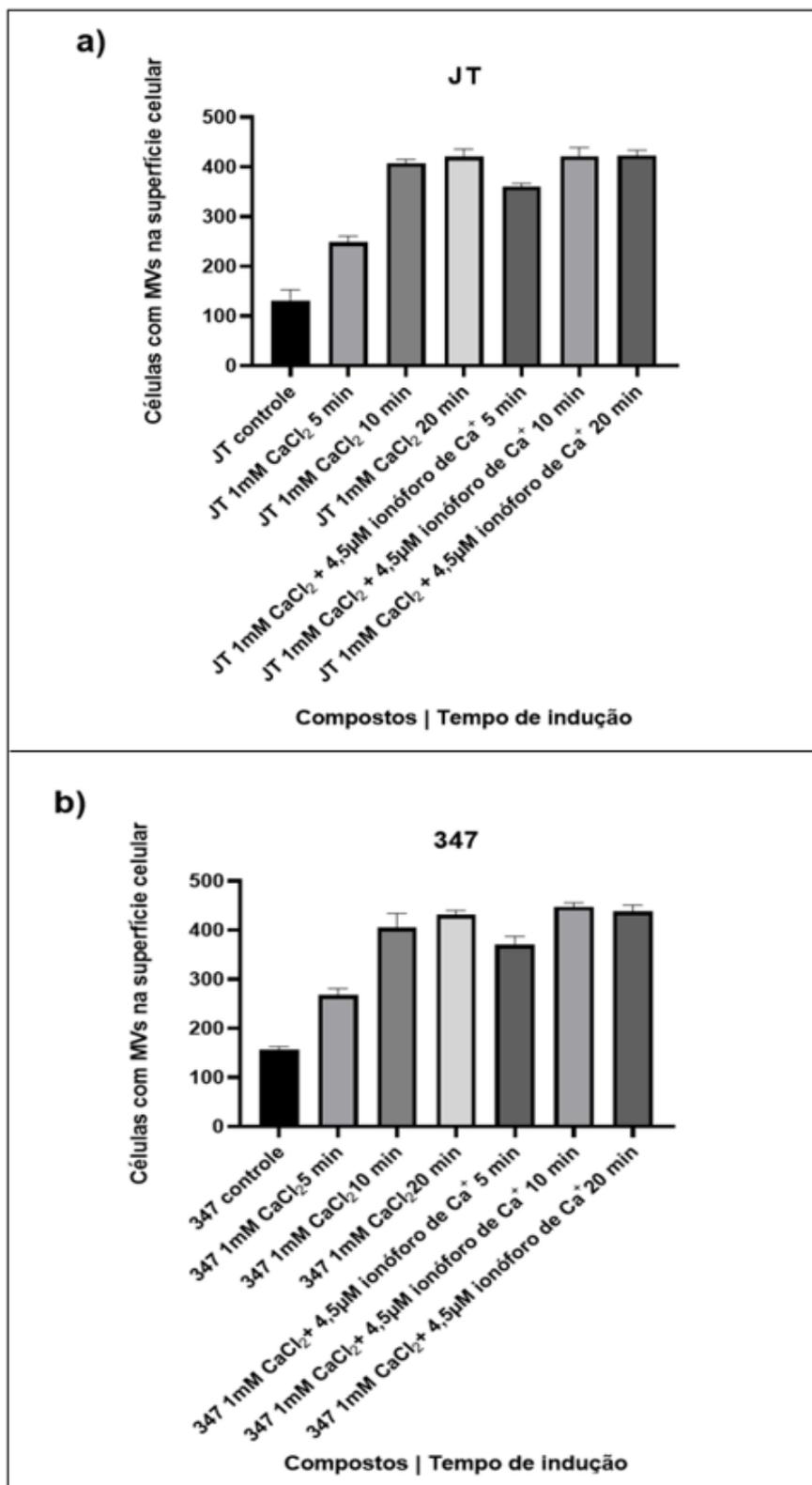
A incubação das células em meio contendo 1mM  $\text{CaCl}_2$  ou 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5 $\mu\text{M}$  de ionóforo de cálcio mostram que as tricomonas são induzidas a secretar uma população de MVs com tamanho heterogêneo.



**Figura 8.** Microscopia de varredura de *T. vaginalis* cepa JT após tratamento com 1mM de  $\text{CaCl}_2$ . **(a)** Célula controle com morfologia típica; **(b)** Células após 5 minutos de tratamento, note MVs aparentemente sendo liberadas (setas); **(c)** Após 10 minutos de tratamento, as células exibem uma maior intensidade de MVs aderidas na superfície celular (setas) e algumas brotando da membrana ondulante; **(d)** Células tratadas por 20 minutos exibem MVs de diferentes tamanhos (setas) e projeções de membrana como “ruffles” (cabeça de seta). Ax, axóstilo; FA, flagelos anteriores; MO, membrana ondulante.

Os inóculos foram tratados com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  ou com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5 $\mu\text{M}$  de ionóforo de cálcio, com intuito de facilitar a liberação de vesículas, estimuladas pelo cálcio. As observações feitas por MEV foram processadas com as células em tratamento por 5, 10 e 20 minutos. No entanto, para as análises utilizando MET apenas as amostras tratadas por 10 e 20 minutos foram processadas. Os controles foram incubados em meio padrão sem adição destes compostos.

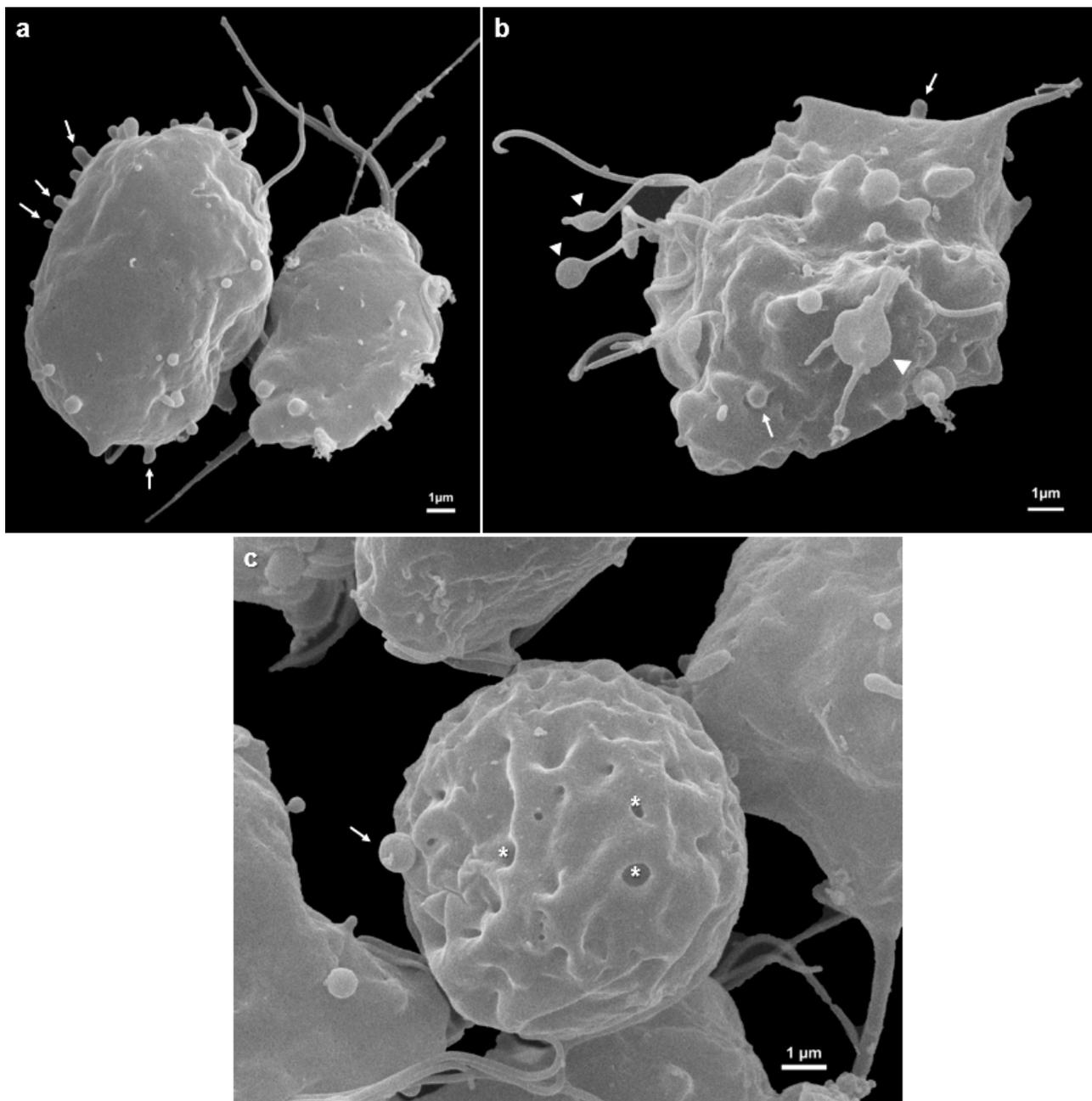
Em ambas as cepas de *T. vaginalis*, foi possível observar, de acordo com o tratamento, que células tratadas por 5, 10 e 20 minutos com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  apresentam uma maior intensidade de MVs na superfície celular (Figs. 8b-d, 11b-d). Especialmente, as células que foram tratadas por 10 minutos (Figs. 8c, 11c). Nos experimentos com estímulo de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  seguido de 4,5 $\mu\text{M}$  de ionóforo de cálcio as células apresentaram um menor número de MVs aderidas na superfície celular (Figs. 10, 12-13). Durante as observações destes ensaios de indução de processos secretórios, foram realizadas contagens utilizando MEV das células que apresentavam MVs na superfície celular (Fig. 9). Nestas análises, observamos que a cepa de *T. vaginalis* 347 (Fig. 9b) apresentou uma quantidade um pouco maior de MVs sendo liberadas que com a cepa JT (Fig. 9a), quando comparados os controles e os respectivos tratamentos. Em ambas as cepas, o tratamento com estes compostos por 10 minutos foi o que demonstrou um número maior de células liberando estas vesículas. Cabe ainda ressaltar que nesse tempo a incubação apenas com cálcio alcançou a maior intensidade de liberação de vesículas uma vez que os dados são praticamente iguais aos obtidos com o tratamento subsequente com o ionóforo de cálcio. Destaca-se que nesse experimento analisamos as vesículas ainda associadas à superfície do parasita e não as vesículas liberadas efetivamente e que foram quantificadas usando outra metodologia como será descrito mais abaixo.



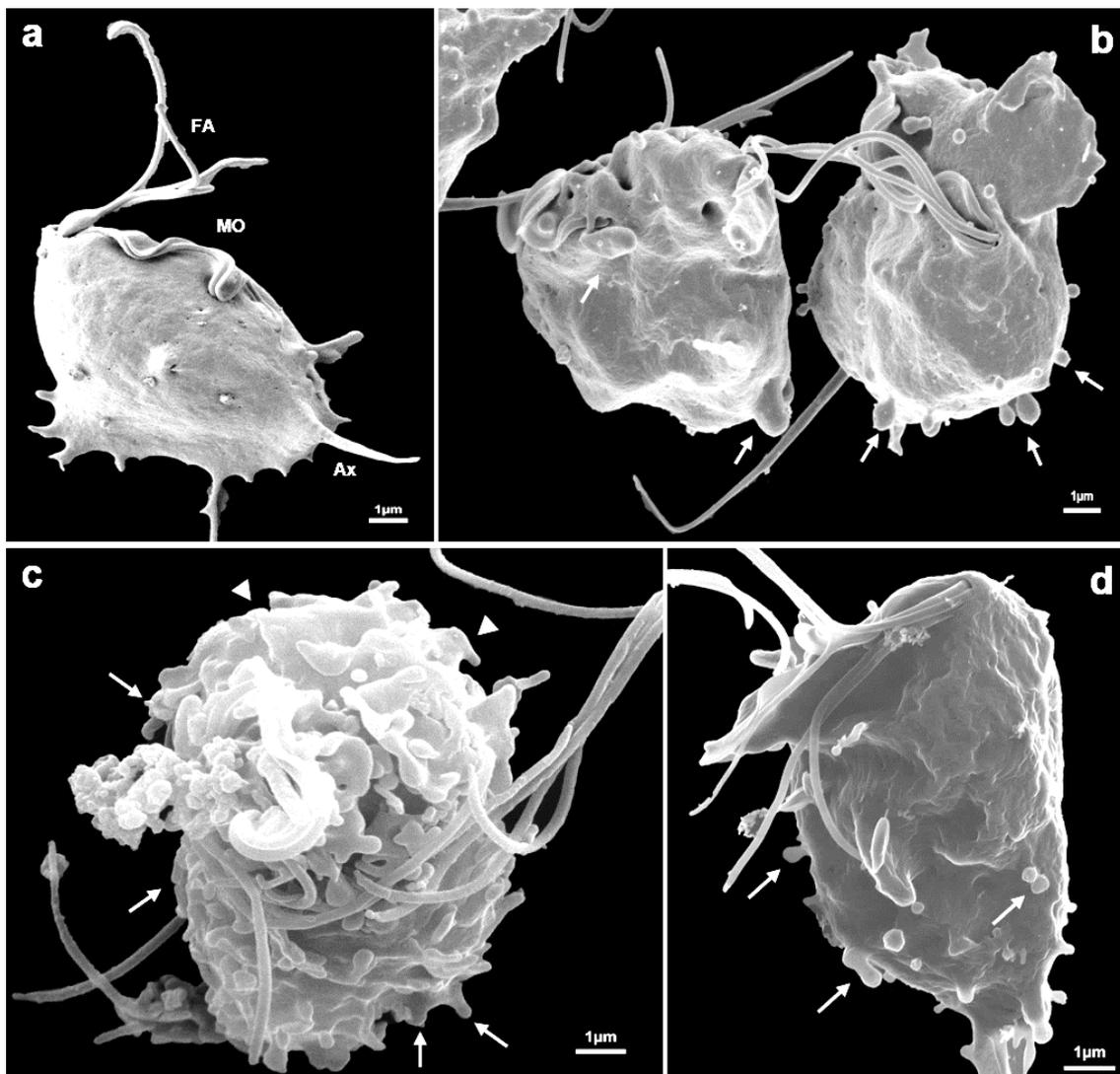
**Figura 9.** Quantificação do número de parasitas contendo microvesículas na membrana plasmática. **(a)** Número de parasitas da cepa JT, menos patogênica; **(b)** Número de parasitas da cepa 347, mais patogênica.

Em contrapartida, os sobrenadantes destes ensaios apresentam uma maior população de MVs quando comparados com os tratados apenas com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  (Fig. 25).

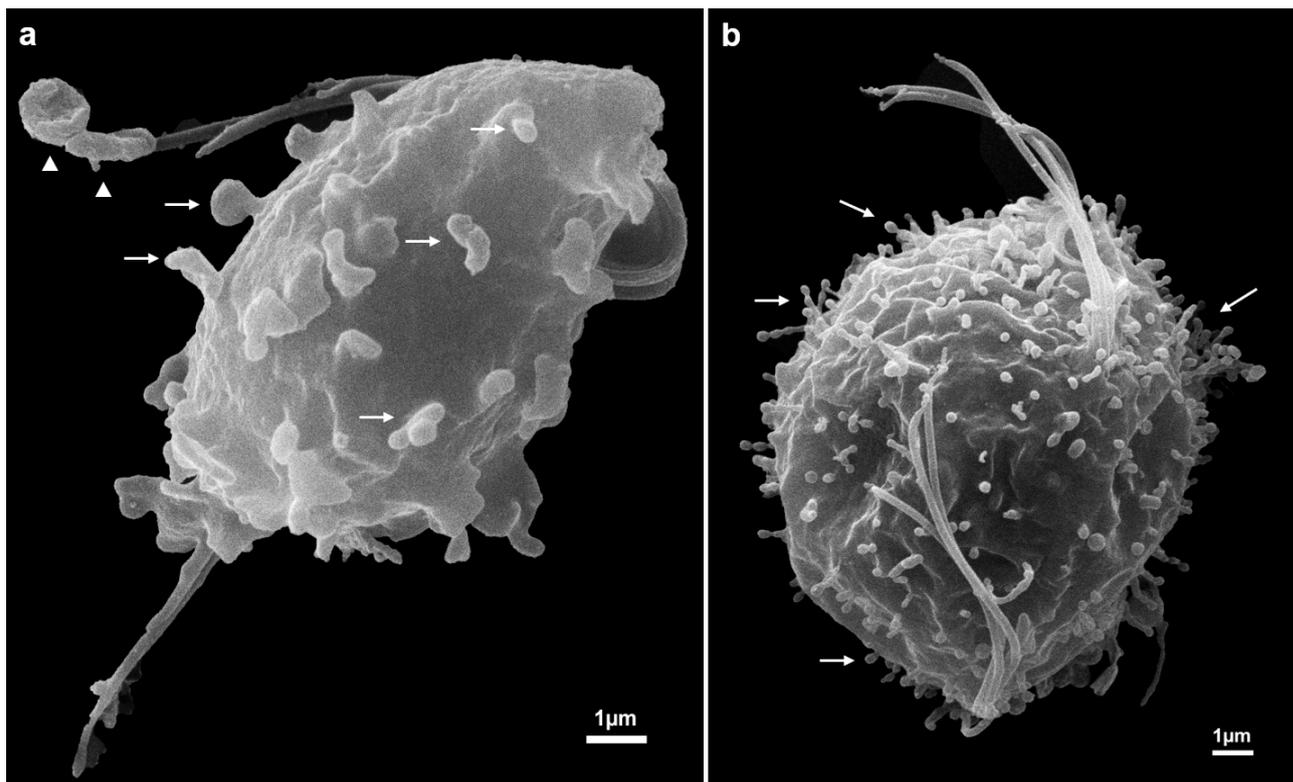
Nestas células tratadas com ionóforo de cálcio por 5 e 10 minutos, utilizando-se as cepas JT e 347, respectivamente, foram observadas intumescências na ponta dos flagelos (Figs. 10b, 12a), semelhantes as estruturas extra-axonemais recentemente descritas (COCERES et al., 2021). Durante 20 minutos de tratamento com o ionóforo de cálcio, foram observadas células arredondadas, iniciando o processo de internalização dos flagelos e formas típicas de pseudocistos (formas endoflagelares) (Figs. 10c, 12b, 13). Flagelos estes que apresentaram MVs brotando e sendo liberadas (Fig. 14a), assim vistos com bastante intensidade em células em divisão (Fig. 12b).



**Figura 10.** Microscopia eletrônica de varredura representativa da liberação de microvesículas de *T. vaginalis* cepa JT após tratamento com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5 $\mu\text{M}$  de ionóforo de cálcio. **(a)** Células tratadas por 5 minutos exibindo microvesículas na superfície celular (setas); **(b)** Células após tratamento por 10 minutos, observam-se além das microvesículas (setas) dilatações na extremidade dos flagelos (cabeça de seta); **(c)** Células tratadas por 20 minutos, observamos a internalização dos flagelos. Note algumas microvesículas (seta) e pontos de endocitose (asteriscos).



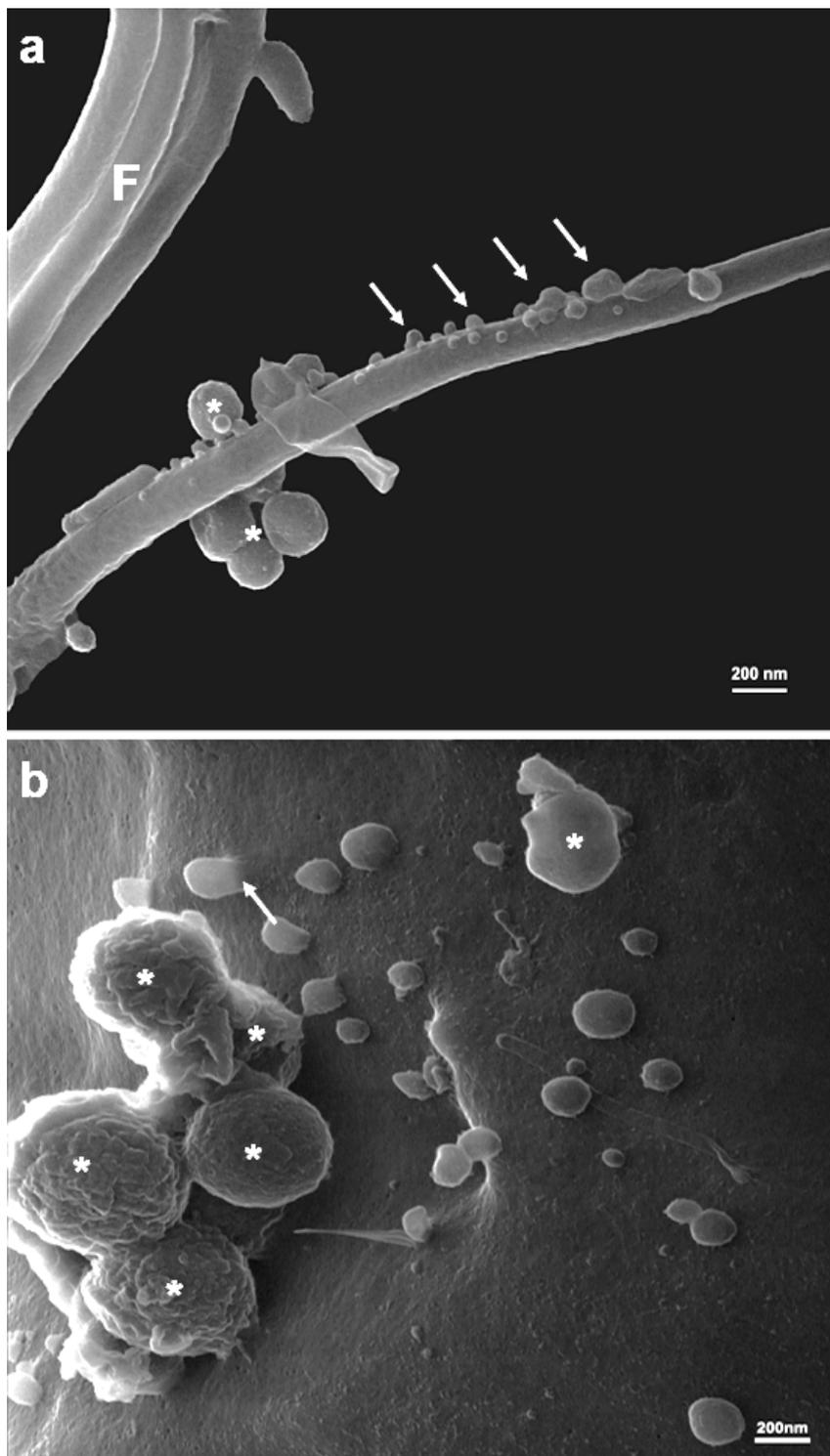
**Figura 11.** Microscopia de varredura de *T. vaginalis* cepa 347 após tratamento com 1mM de  $\text{CaCl}_2$ . Controle (a); (b) Após tratamento por 5 minutos, é possível notar microvesículas projetando-se da membrana plasmática do parasita (setas); (c) Após 10 minutos de tratamento, as células exibem uma maior intensidade de microvesículas aderidas à superfície celular (setas), algumas brotando da membrana ondulante e intumescência da membrana plasmática (cabeça de seta); (d) Células tratadas por 20 minutos exibindo microvesículas de tamanhos heterogêneos na superfície celular (setas) e projeções próxima à membrana ondulante.



**Figura 12.** Microscopia eletrônica de varredura representativa da liberação de microvesículas de *T. vaginalis* cepa 347 após tratamento com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5 $\mu\text{M}$  de ionóforo de cálcio. **(a)** Células tratadas por 5 minutos exibindo microvesículas na superfície celular (setas) e dilatações na extremidade dos flagelos (cabeça de seta); **(b)** Note a célula em divisão após tratamento por 10 minutos exibindo uma maior intensidade de microvesículas na superfície celular (setas).



**Figura 13.** Microscopia de varredura de alta resolução com íons Hélio representativa da liberação de microvesículas de *T. vaginalis* cepa 347 após tratamento com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5µM de ionóforo de cálcio por 20 minutos. Note a presença de microvesículas na superfície da célula (setas), axóstilo não aparente, grande MV sendo liberada (cabeça de seta) e pequenas microvesículas aderidas nos flagelos. F, flagelos.



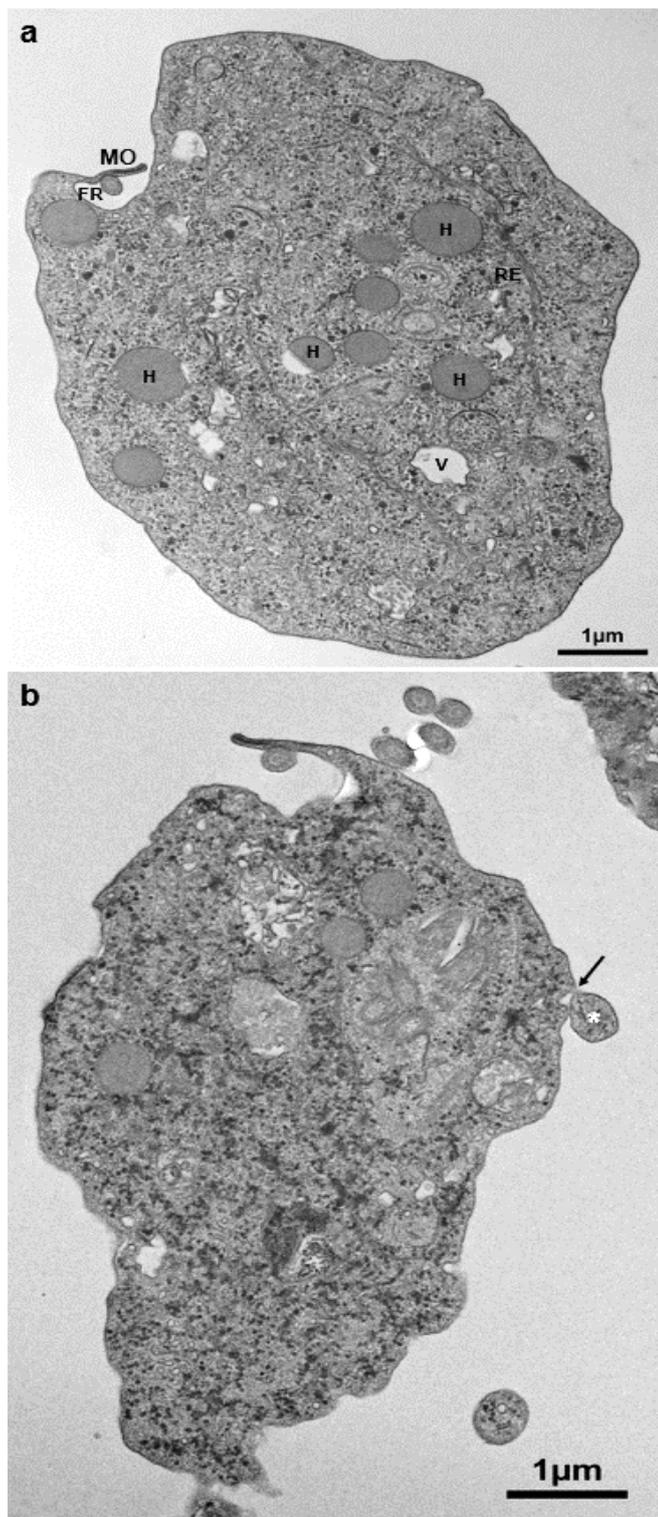
**Figura 14.** Microscopia de varredura de alta resolução com íons Hélio em maior aumento das observações da liberação de microvesículas projetando-se do flagelo **(a)** e da membrana plasmática **(b)** dos parasitas arredondados sob condições de tratamento por 20 minutos com  $4,5\mu\text{M}$  de ionóforo de cálcio. Note a presença de microvesículas aderidas (asteriscos) e, aparentemente, brotando (setas) destas superfícies. F, flagelos.

## 5.2. Observações ultraestruturais de *T. vaginalis* em processo secretório induzido por $\text{CaCl}_2$ e ionóforo de cálcio

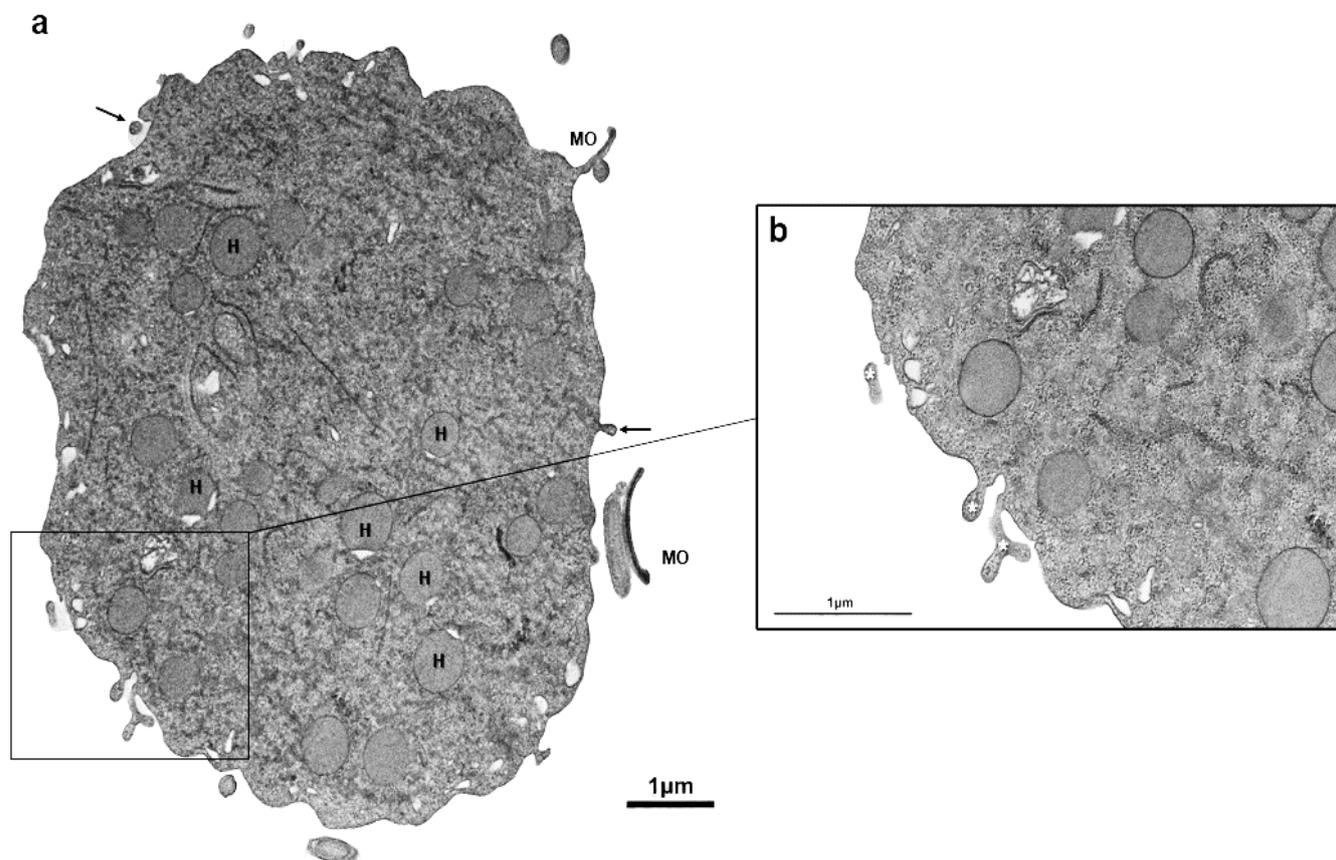
A biogênese das diferentes vesículas extracelulares se dá por mecanismos distintos, como, por exemplo, o influxo de cálcio que estimula a liberação de MVs a partir do brotamento da membrana plasmática. Durante nossos ensaios de indução e após as análises por microscopia de varredura, buscamos investigar possíveis alterações ultraestruturais nos parasitas tratados comparados aos controles. No processamento de rotina para a microscopia eletrônica de transmissão conseguimos observar (Figs. 15-22) que as células tratadas por 10 e 20 minutos com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  ou 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5 $\mu\text{M}$  de ionóforo de cálcio apresentaram eventos importantes, como alterações na conformação da membrana plasmática nas células tratadas, a qual dá origem ao brotamento das MVs, intensa formação de corpos multivesiculares (Figs. 17, 18, 19b, 20-21), compartimentos que, por fusão com a membrana plasmática, liberam exossomos no meio extracelular, e internalização dos flagelos (Figs. 18, 22).

Nesta modalidade de microscopia, observamos o momento em que um grande MV estaria se projetando da membrana plasmática dos parasitas, cepa JT (Fig. 15b) e cepa 347 (Fig. 19b), tratados por 10 minutos com 1mM de  $\text{CaCl}_2$ . Com o tratamento por 20 minutos, analisamos uma célula em divisão, da cepa JT, com uma intensa liberação de MVs da superfície celular (Fig. 16). Na cepa 347 tratada com  $\text{CaCl}_2$  por 20 minutos (Fig. 20), podemos observar detalhes de corpos multivesiculares e a intensa ondulação da membrana do parasita. O mesmo foi observado para células desta mesma cepa que foram tratadas por 10 minutos com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5 $\mu\text{M}$  ionóforo de cálcio (Fig. 21).

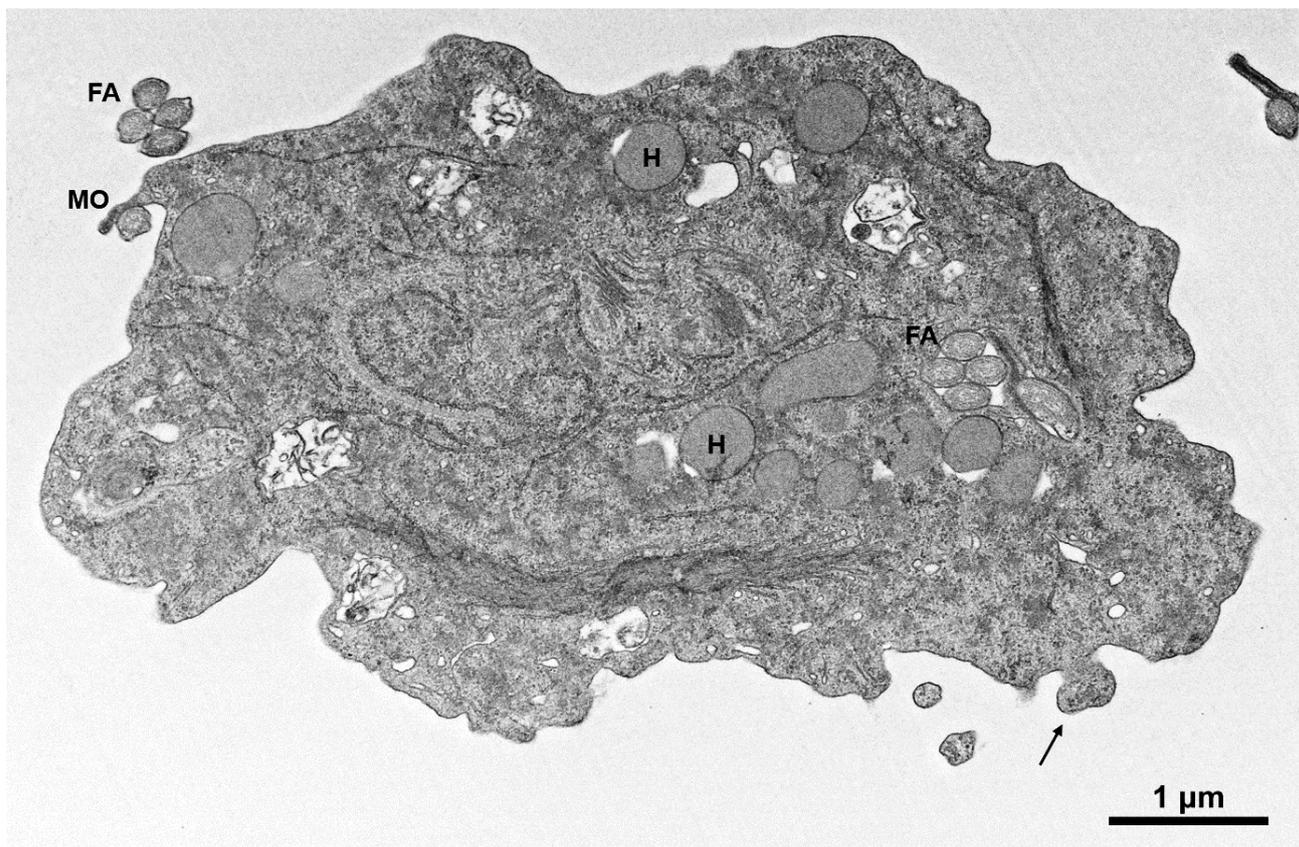
Os resultados revelaram que, assim como na microscopia eletrônica de varredura e na varredura de alta resolução com íons Hélio, as células tratadas com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5 $\mu\text{M}$  ionóforo de cálcio por 20 minutos (Figs. 18a, 22a) iniciam um processo de internalização dos flagelos ou já assumem características típicas de pseudocistos (formas endoflagelares). Ainda assim, observamos a presença de corpos multivesiculares (Figs. 18a-b, 22a-b) e uma população de MVs com tamanho heterogêneo no espaço extracelular (Fig. 22a-b).



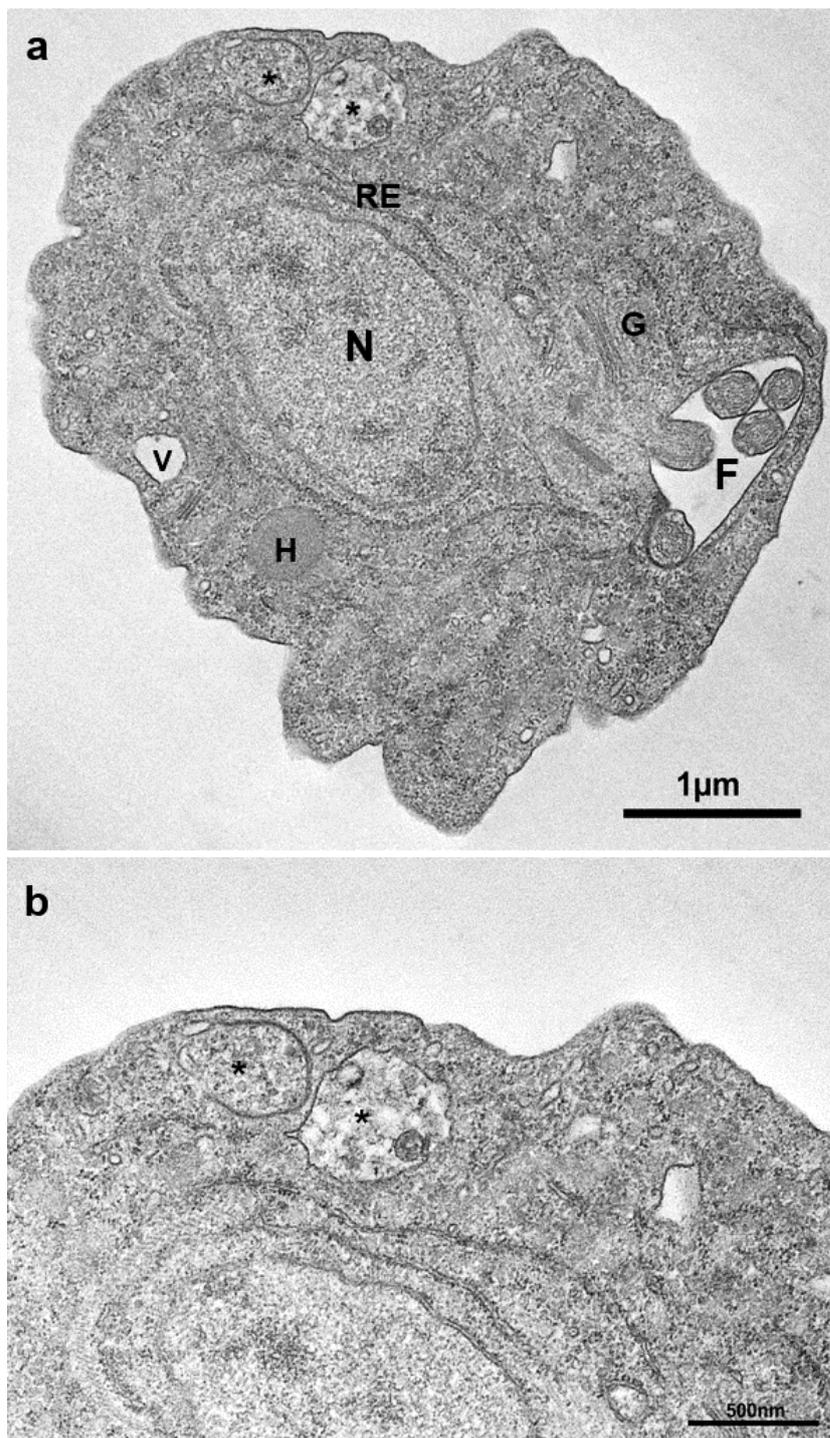
**Figura 15.** Microscopia eletrônica de transmissão de *T. vaginalis* cepa JT controle (a) e célula após tratamento com 1Mm CaCl<sub>2</sub> por 10 minutos (b). Note a liberação (seta) de uma microvesícula (asterisco). FR, flagelo recorrente; H, hidrogenossomo; MO, membrana ondulante; RE, retículo endoplasmático; V, vacúolo.



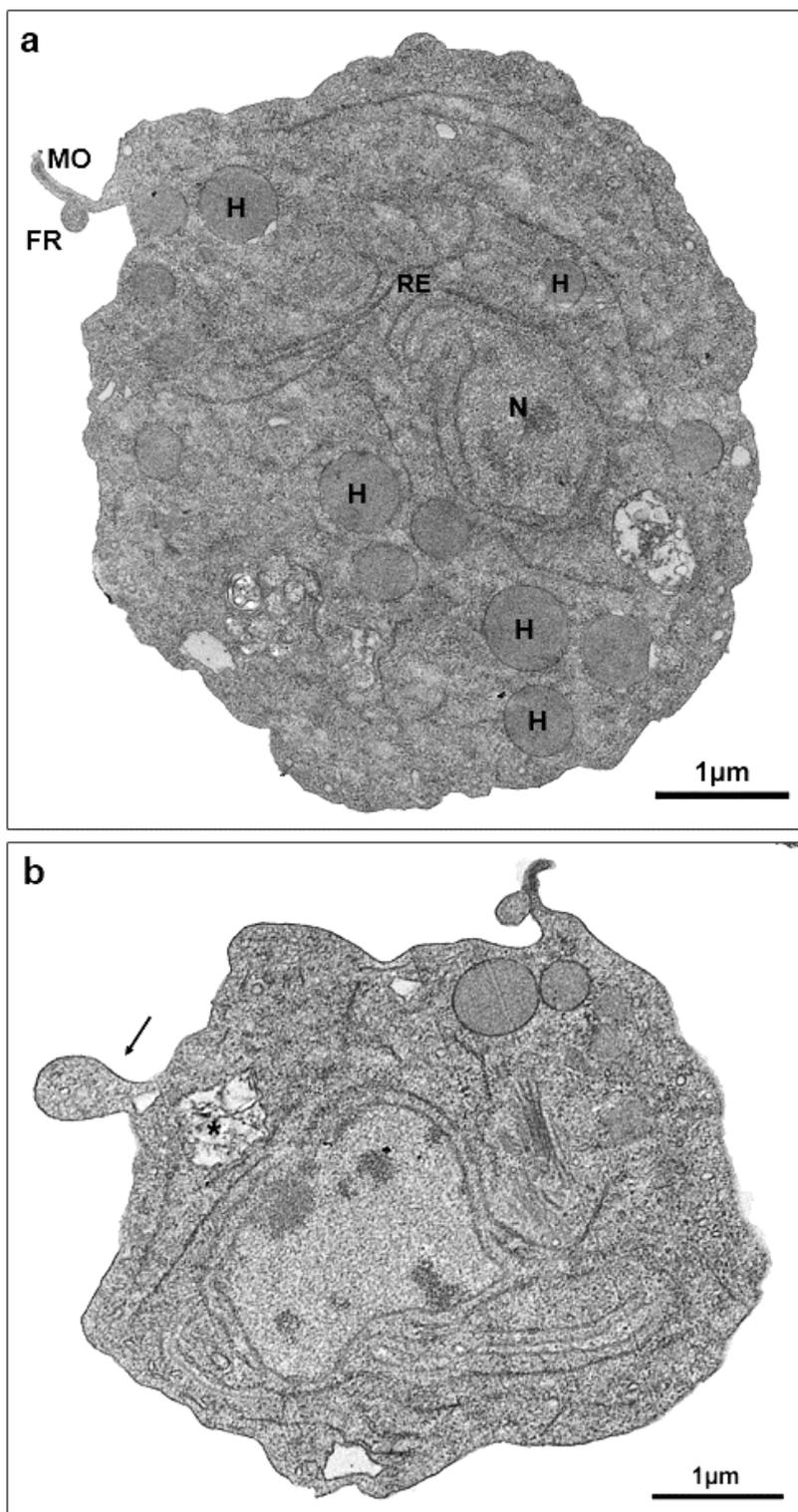
**Figura 16.** Microscopia eletrônica de transmissão de *T. vaginalis*, cepa JT, tratadas com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  por 20 minutos. **(a)** Observe a presença de microvesículas (setas) brotando da membrana plasmática; **(b)** Em maior aumento detalhes no processo de liberação das microvesículas (asteriscos). H, hidrogenossomos; MO, membrana ondulante.



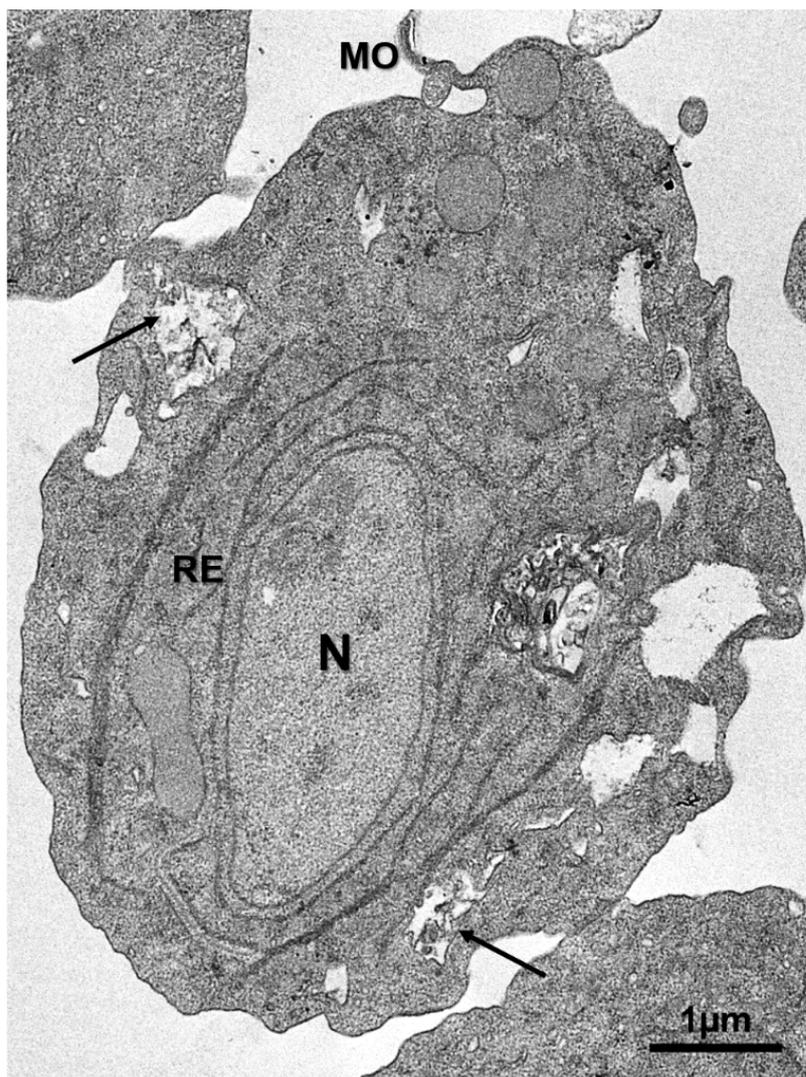
**Figura 17.** Microscopia eletrônica de transmissão de *T. vaginalis*, cepa JT, tratada com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5μM de ionóforo de cálcio por 10 minutos. Note uma proeminência de membrana plasmática (seta), semelhante a observada em células aparentemente secretando material no meio extracelular. Os flagelos anteriores internalizados indicam que o parasita está em processo de formação de pseudocisto. FA, flagelos anteriores; H, hidrogenossomo; MO, membrana ondulante.



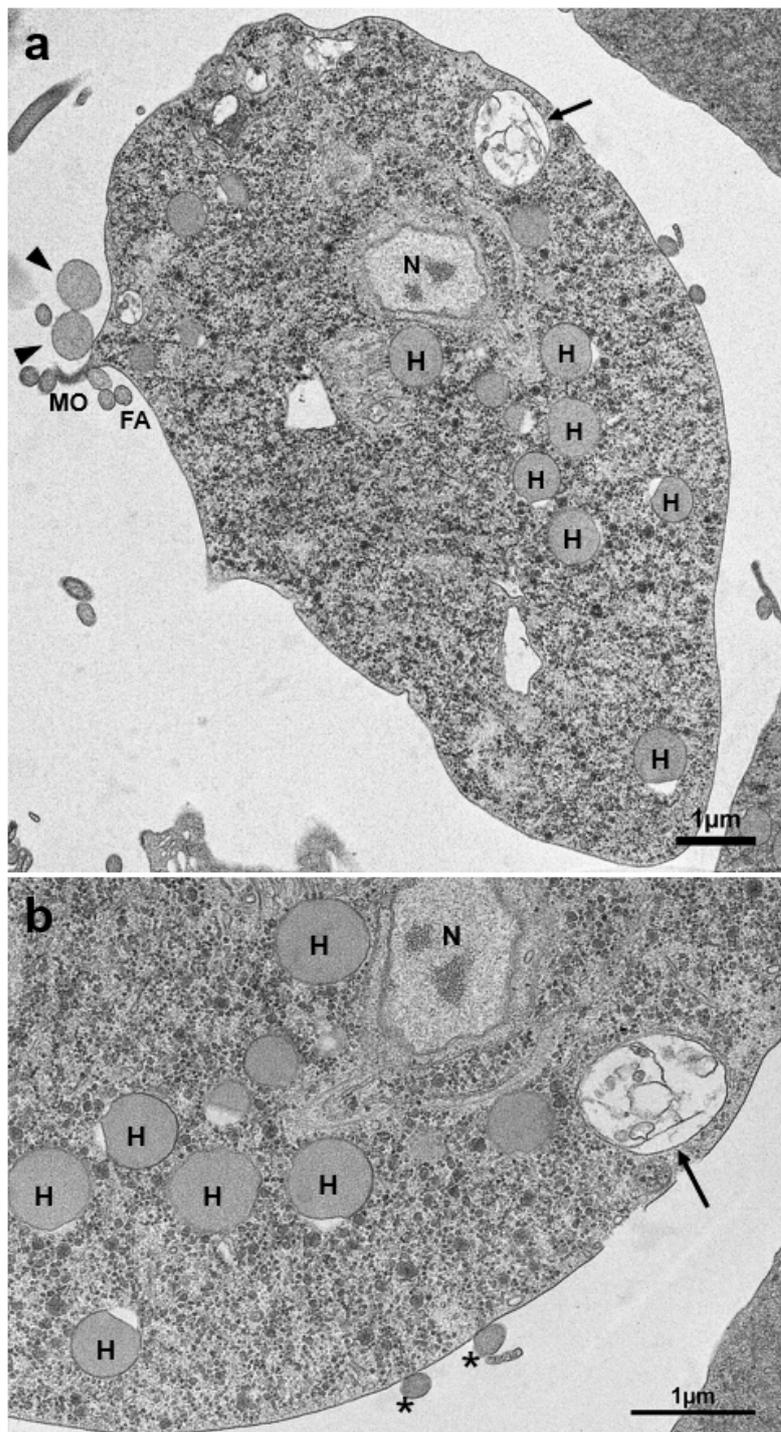
**Figura 18.** Microscopia eletrônica de transmissão após tratamento com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5µM ionóforo de cálcio por 20 minutos de *T. vaginalis*, cepa JT. (a) Foram observados parasitos na forma endoflagelar, com regiões vesiculares (asteriscos); (b) Em maior aumento, é possível notar com mais detalhes estruturas semelhantes as microvesículas (asteriscos). F, flagelos; G, Golgi; H, hidrogenossomo; N, núcleo; RE, retículo endoplasmático; V, vacúolo.



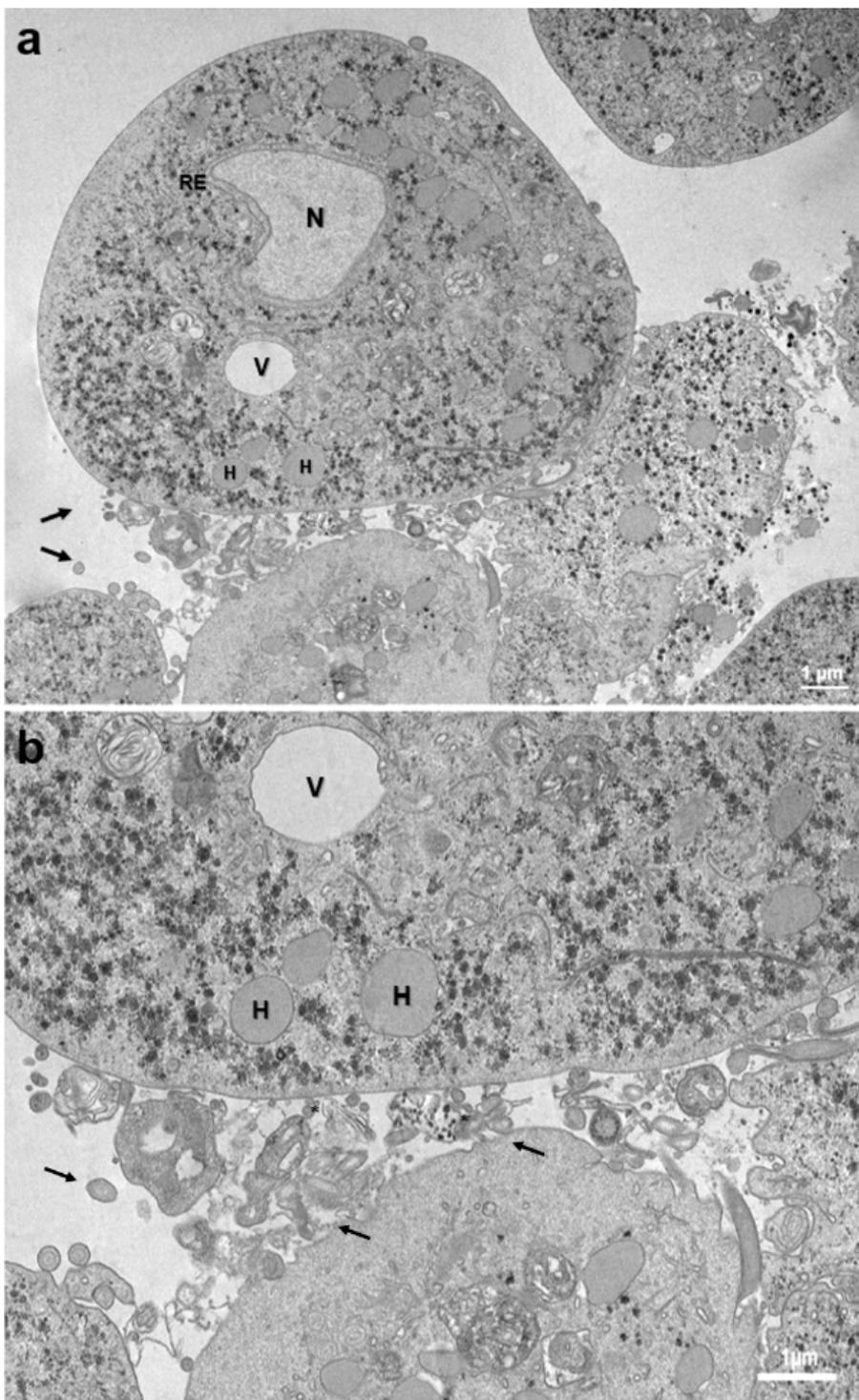
**Figura 19.** Microscopia eletrônica de transmissão de *T. vaginalis* cepa 347 controle (a) e célula após tratamento com 1Mm CaCl<sub>2</sub> por 10 minutos (b). Note uma protusão de membrana (seta) próxima a um corpo multivesicular (asterisco). FR, flagelo recorrente; H, hidrogenossomo; MO, membrana ondulante N, núcleo; RE, retículo endoplasmático; V, vacúolo.



**Figura 20.** Microscopia eletrônica de transmissão de *T. vaginalis*, cepa 347, após tratamento com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  por 20 minutos. Note a intensa ondulação da membrana plasmática do parasita e a presença de corpos multivesiculares (setas). MO, membrana ondulante; N, núcleo; RE, retículo endoplasmático.



**Figura 21.** Microscopia eletrônica de transmissão de *T. vaginalis*, cepa 347, tratada com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5 $\mu\text{M}$  ionóforo de cálcio por 10 minutos. (a) Observe a presença de corpos multivesiculares (seta) e vesículas do lado externo (cabeça de setas); (b) Em maior aumento, observamos vesículas do lado externo (asterisco) e a seta aponta um corpo multivesicular. FA, flagelos anteriores; H, hidrogenossomo; MO, membrana ondulante; N, núcleo.

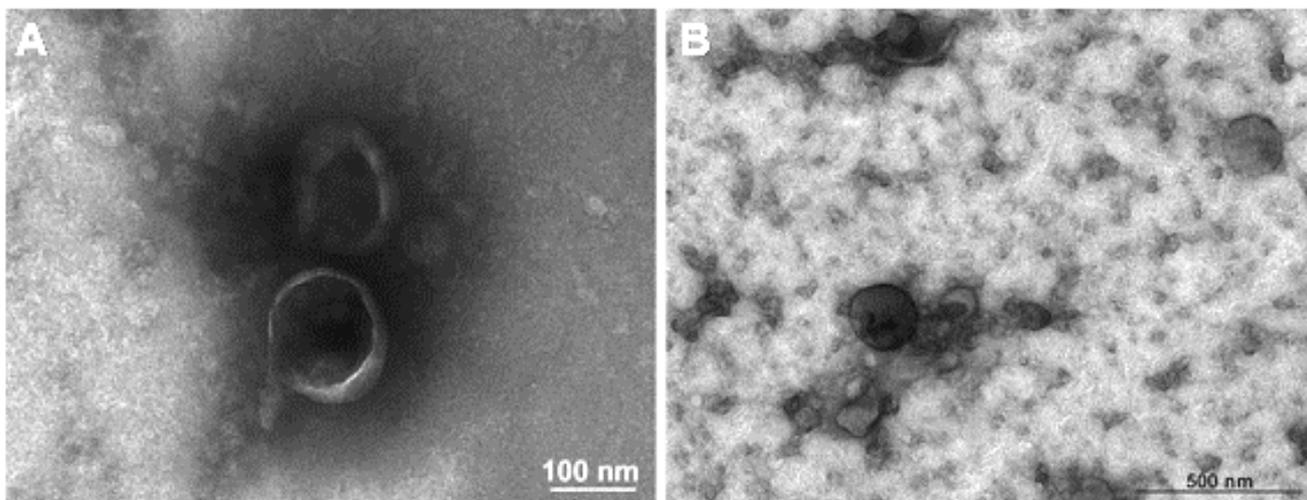


**Figura 22.** Microscopia eletrônica de transmissão após tratamento com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5 $\mu\text{M}$  ionóforo de cálcio por 20 minutos de *T. vaginalis* cepa 347. (a) Células arredondadas após tratamento exibindo microvesículas na superfície celular. Observamos uma intensa quantidade de microvesículas (setas), sugerindo que houve liberação e células com aspecto saudável; (b) Um maior aumento desta região apresentando intensa quantidade das microvesículas já do lado extracelular (setas). H, hidrogenossomos; N, núcleo; RE, retículo endoplasmático; V, vacúolo.

### 5.3. Morfologia das microvesículas liberadas por *T. vaginalis*

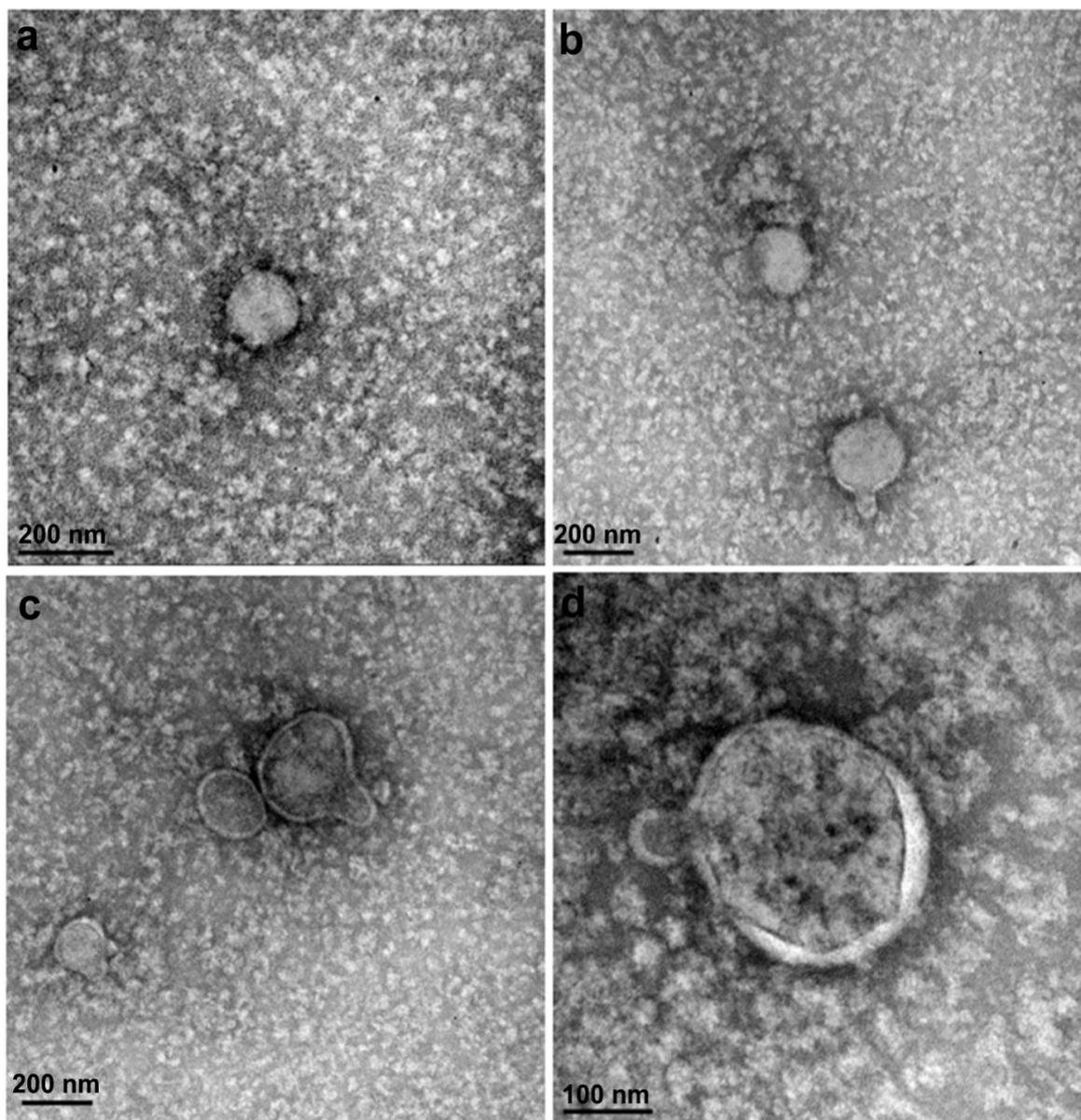
Uma vez que foi observada a presença de MVs por *T. vaginalis* de forma constitutiva e após tratamento com cloreto de cálcio e ionóforo de cálcio, em determinadas concentrações e períodos distintos, analisamos a morfologia e a cinética de liberação de MVs, em MET e pelo DLS, respectivamente, por tempo de tratamento das células. Para estes experimentos, foram inoculados  $1 \times 10^6$  parasitos em meio TYM sem soro e na presença de 1mM  $\text{CaCl}_2$  ou de 1mM  $\text{CaCl}_2$  + 4,5 $\mu\text{M}$  ionóforo de cálcio. Nas análises de controle, as células foram incubadas apenas em meio sem soro. Após o tempo de tratamento de cada amostra, as células foram separadas do sobrenadante por centrifugação diferencial e o meio com as MVs passou por um filtro estéril com membrana de 0,22 $\mu\text{m}$  para evitar contaminantes como restos celulares. O meio isento de células foi levado para a ultracentrifugação, para que as MVs fossem concentradas e depois ressuspensas em PBS estéril.

Nos experimentos para caracterizar a estrutura das MVs, foram utilizados sobrenadantes das células controle. As amostras concentradas foram depositadas em grades de cobre cobertas com um filme de formvar e contrastadas com 5% de acetato de uranila (Fig. 23 a-b), onde é possível notar perfis de membrana semelhantes de microvesículas caracteristicamente arredondadas.



**Figura 23.** Visão geral da fração enriquecida de microvesículas obtidas após processamento de centrifugação diferencial visualizada por microscopia eletrônica de transmissão utilizando contrastação negativa com acetato de uranila. **(a)** microvesículas das *T. vaginalis* JT, cepa menos patogênica; **(b)** microvesículas de *T. vaginalis* 347, cepa mais patogênica.

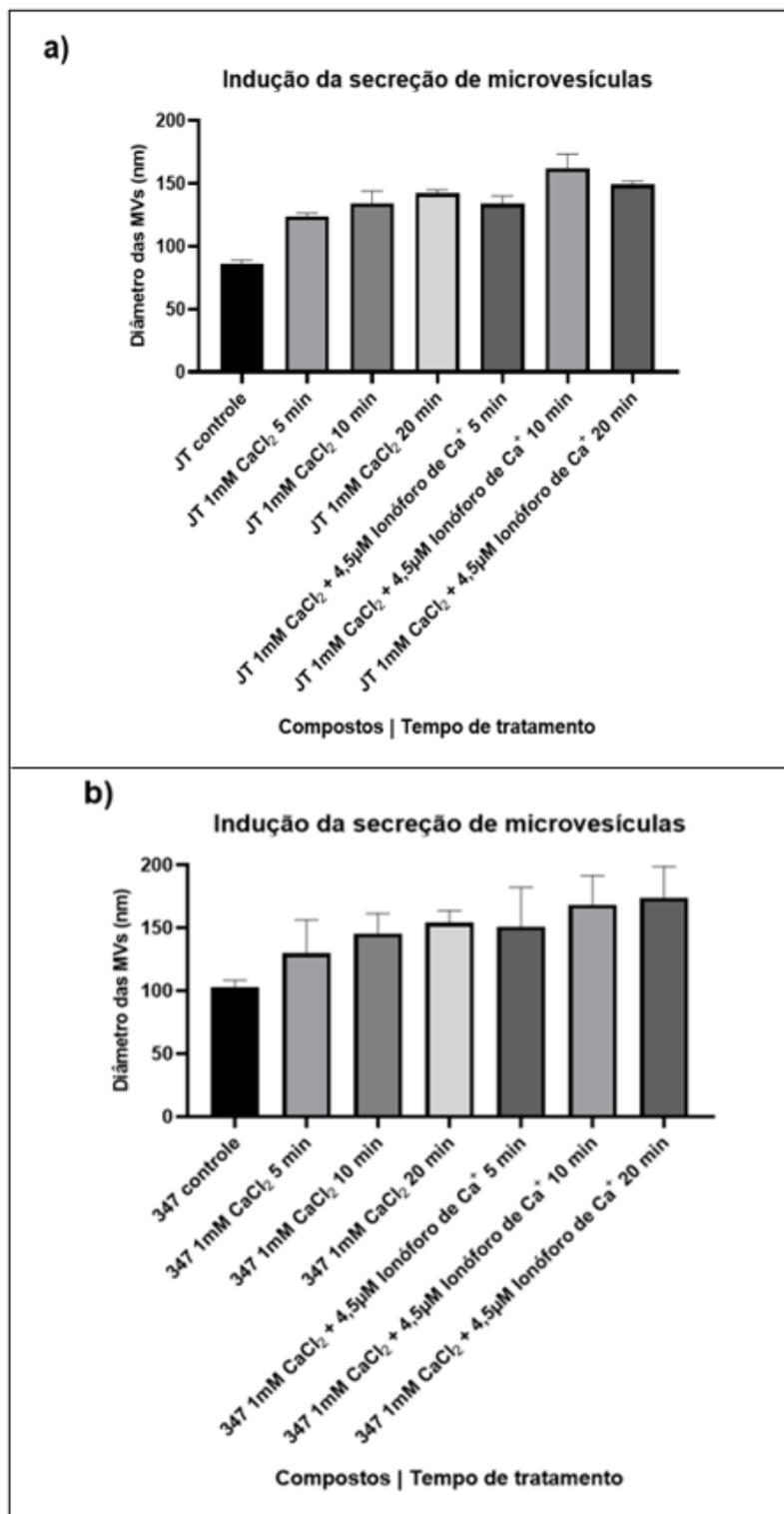
Após estas observações, foi processado um gradiente com diferentes concentrações de sacarose para separar as MVs e coletar frações purificadas, com tamanhos aproximados entre 150 a 250 nm. As frações coletadas foram montadas em grades cobertas com filme de formvar e contrastadas com 3% de aurotioglicose. As estruturas microvesiculares apresentaram perfis semelhantes e tamanhos heterogêneos, observados com melhor resolução (Fig. 24 a-d).



**Figura 24.** Visão geral da fração enriquecida de microvesículas de *T. vaginalis* cepa JT (a-b) e *T. vaginalis* cepa 347 (c-d), cepa de menor e maior patogenicidade, respectivamente, obtidas após ultracentrifugação em um gradiente com diferentes concentrações de sacarose.

Após as observações para caracterizar a morfologia das MVs, as amostras em suspensão foram analisadas pelo DLS, com objetivo de mensurar o perfil de distribuição de tamanho das microvesículas.

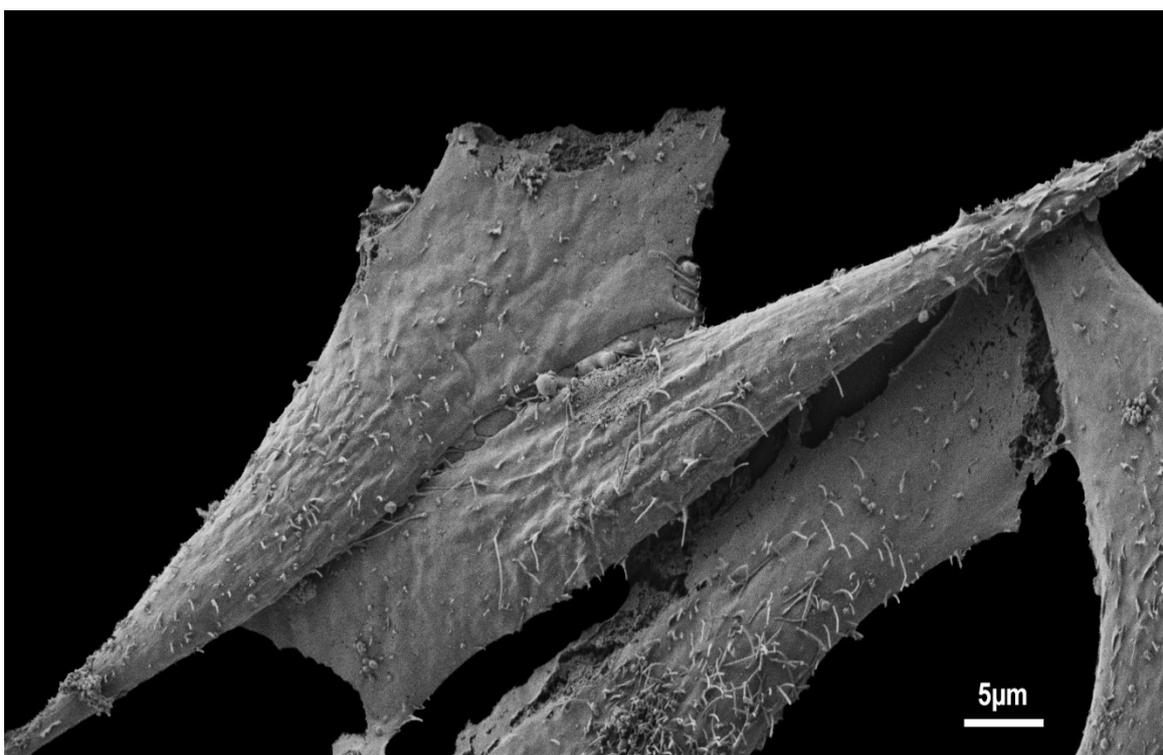
Nas cepas utilizadas para o estudo, JT e 347, as análises demonstraram que *T. vaginalis* produz MVs de tamanhos diferentes, após tratamento com cálcio, diferentemente do controle, e com o decorrer do tempo de tratamento as células liberam MVs maiores (Fig. 25), com tamanho médio entre 80 nm e 200 nm. As MVs da cepa 347 (Fig. 25b) demonstraram ser maiores que as da cepa JT (Fig. 25a). Além disso, é possível observar que é superior o estímulo da liberação de MVs quando as células de ambas as cepas são induzidas também pelo ionóforo de cálcio.



**Figura 25.** Gráficos representativos do espalhamento dinâmico de luz das microvesículas isoladas após concentração por ultracentrifugação. Média do diâmetro das microvesículas secretadas pela cepa JT **(a)** e cepa 347 **(b)**. Os gráficos representativos mostram a média das amostras de três experimentos independentes em triplicata dos perfis de tamanhos das microvesículas.

#### 5.4. Ensaio de interação entre *T. vaginalis* e células hospedeiras

Os experimentos de interação foram feitos na proporção de 5:1, parasitos:célula epiteliais vaginais HMVII (Fig. 26), uma linhagem de células epiteliais vaginais humana, em intervalos de tempos de 30 minutos e 1h com o objetivo de analisar nos primeiros momentos da interação, tanto o comportamento das tricomonas quanto os possíveis danos causados pelos protozoários às células epiteliais.

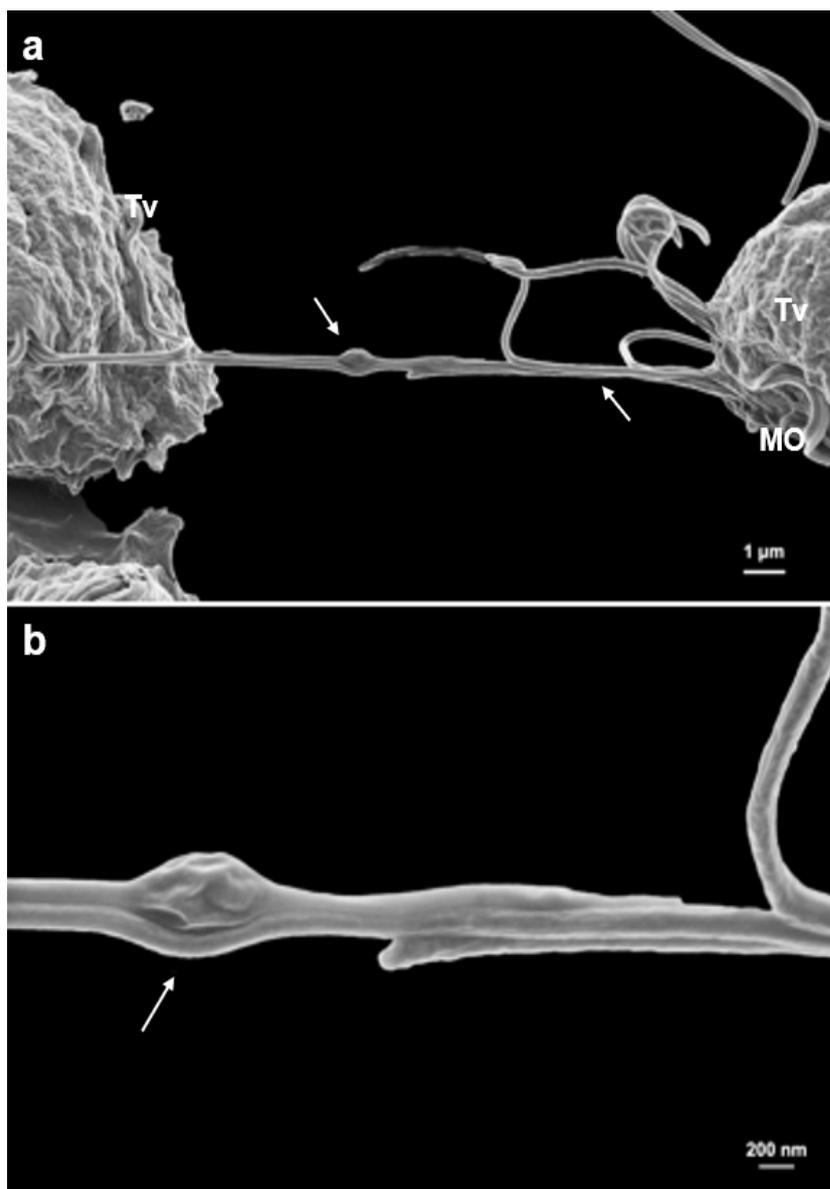


**Figura 26.** Micrografia eletrônica de varredura da linhagem de célula epitelial vaginal humana (HMVII) controle, sem a interação com *T. vaginalis*.

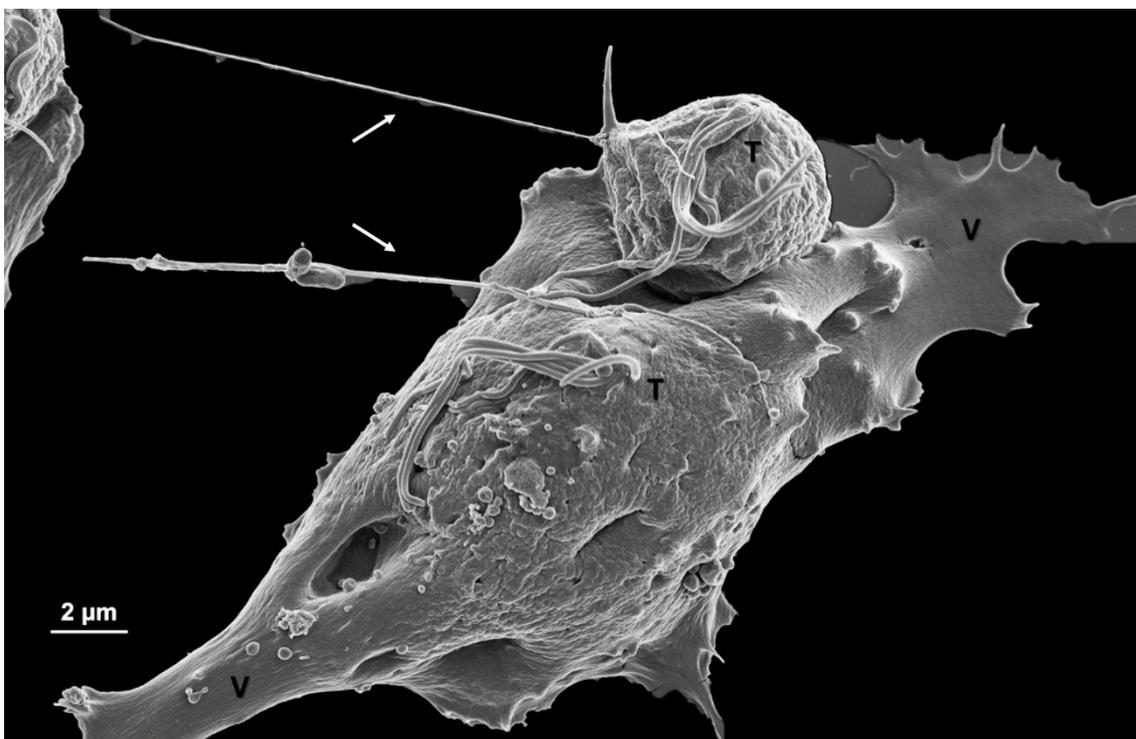
Durante nossas observações, estudando o processo de secreção das microvesículas, notamos que ambas as cepas de *T. vaginalis*, JT e 347, projetam estruturas finas semelhantes a nanotubos de tunelamento (Figs. 27, 28). Estas estruturas podem transportar diversos conteúdos entre as células (Fig. 25b) ou serem projetadas e ficarem livres, sem contato com outra superfície, alcançando tamanhos de quase 10µm (Fig. 28). Após 1 hora de interação, observamos que os parasitas projetam seus flagelos em direção às células epiteliais e parecem

demonstrar uma forte adesão à estas células hospedeiras (Figs. 29-30), envolvendo quase toda sua superfície na forma amebóide (Fig. 30).

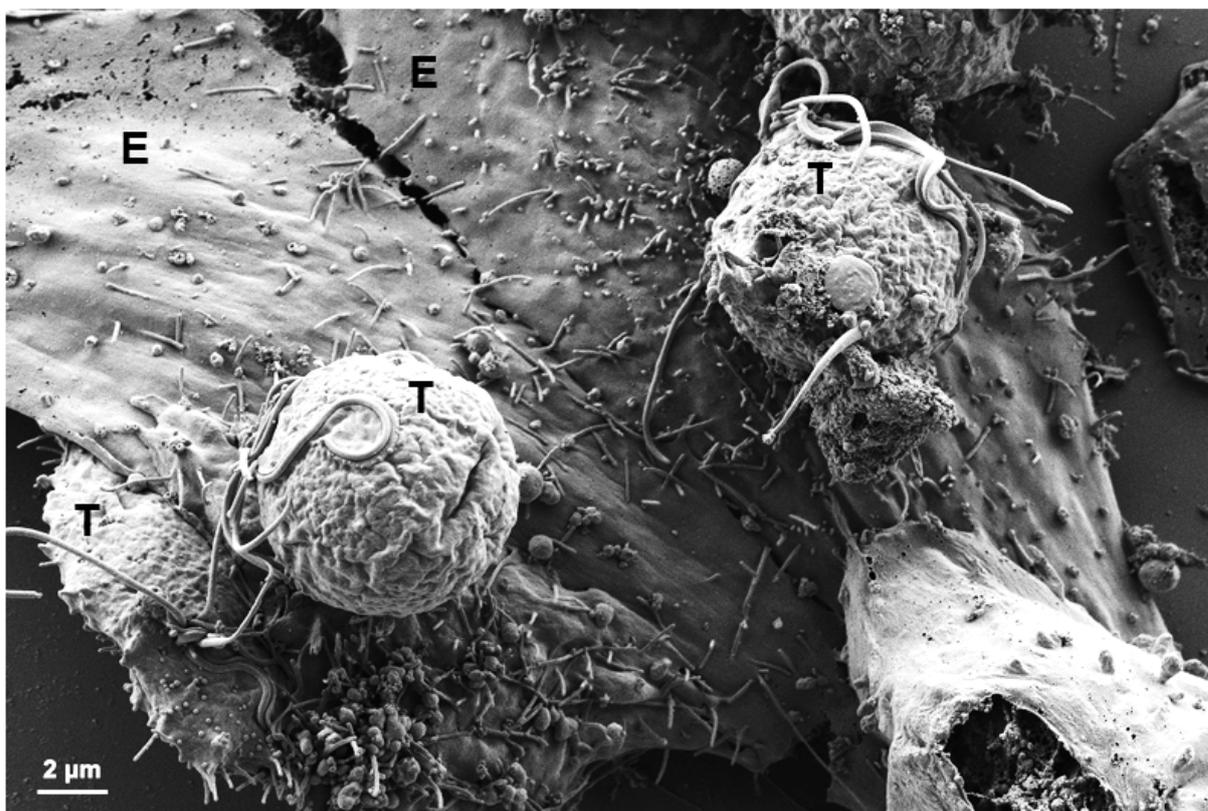
A microscopia de varredura em alta resolução utilizando o microscópio de íons Hélio Orion NanoFab da Zeiss favoreceu a análise e a obtenção de detalhes da interação entre as tricomonas e as células vaginais. Assim, observamos que as células tratadas com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  ou 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5 $\mu\text{M}$  de ionóforo de cálcio por 10 minutos apresentavam diversas MVs na superfície do parasita e sendo liberadas no meio (Figs. 31-34). Percebe-se que os parasitas tratados com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  por 10 minutos aderem melhor a superfície das células hospedeiras (Figs. 31, 33) quando comparadas as células tratadas com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5 $\mu\text{M}$  de ionóforo de cálcio por 10 minutos (Figs. 32, 34). Também observamos a intumescência na extremidade dos flagelos, semelhante às estruturas extra-axonemais formadas em resposta à exposição da célula hospedeira (Fig. 32) e formas endoflagelares (Fig. 34), que apresentam projeções finas, semelhantes a nanotubos, com dilatações condizentes de conteúdo em trânsito. Além de típicas MVs sendo liberadas nas proximidades da superfície da célula hospedeira.



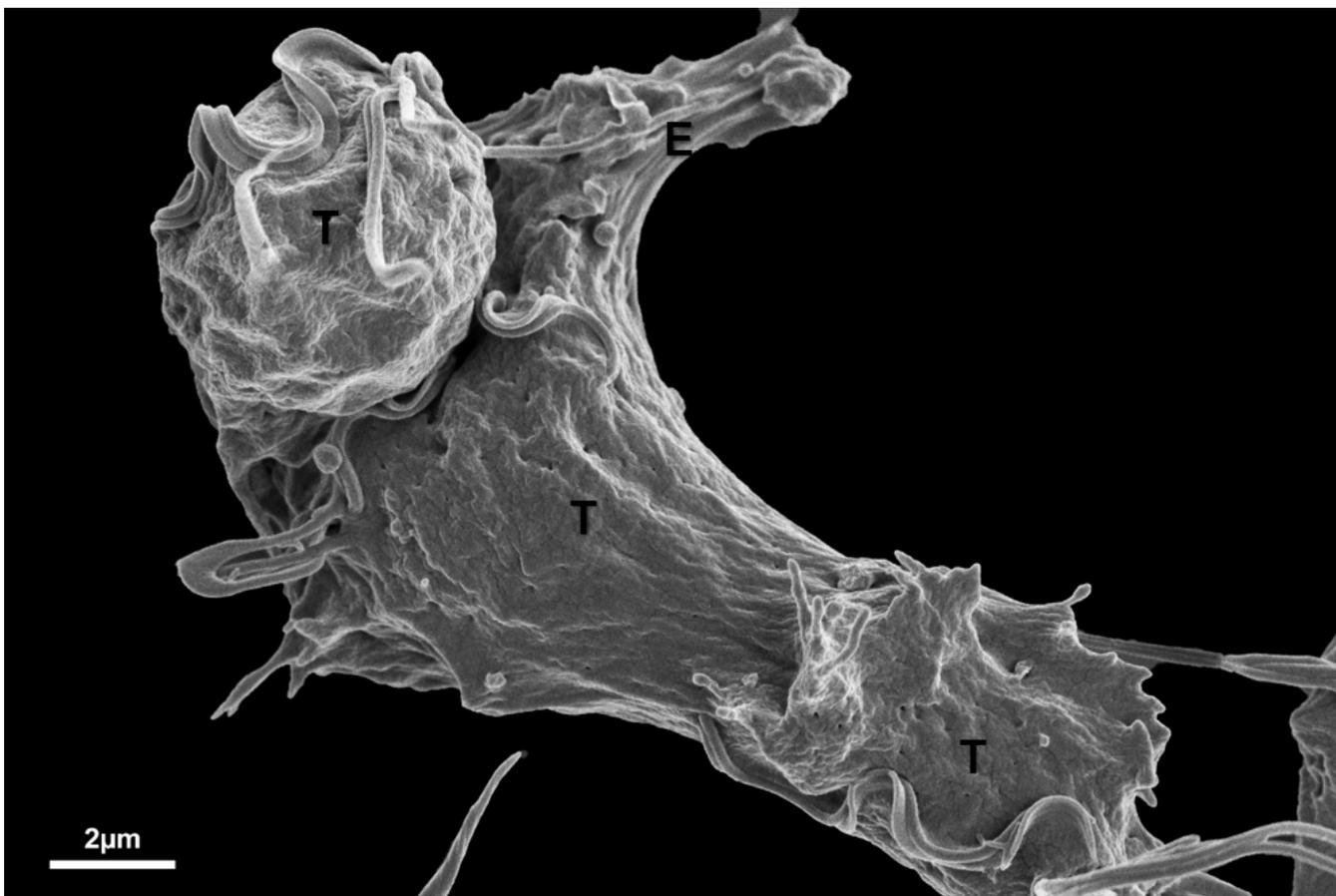
**Figura 27.** Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução da interação entre *T. vaginalis* JT (Tv) com células vaginais HMVII por 30 minutos. Durante as análises, foram feitas observações de estruturas finas semelhantes a nanotubos de tunelamento **(a)** sendo projetadas entre as tricomonas (setas); **(b)** Em maior aumento é possível notar que existe um conteúdo que aparenta ser transportado entre as células (seta).



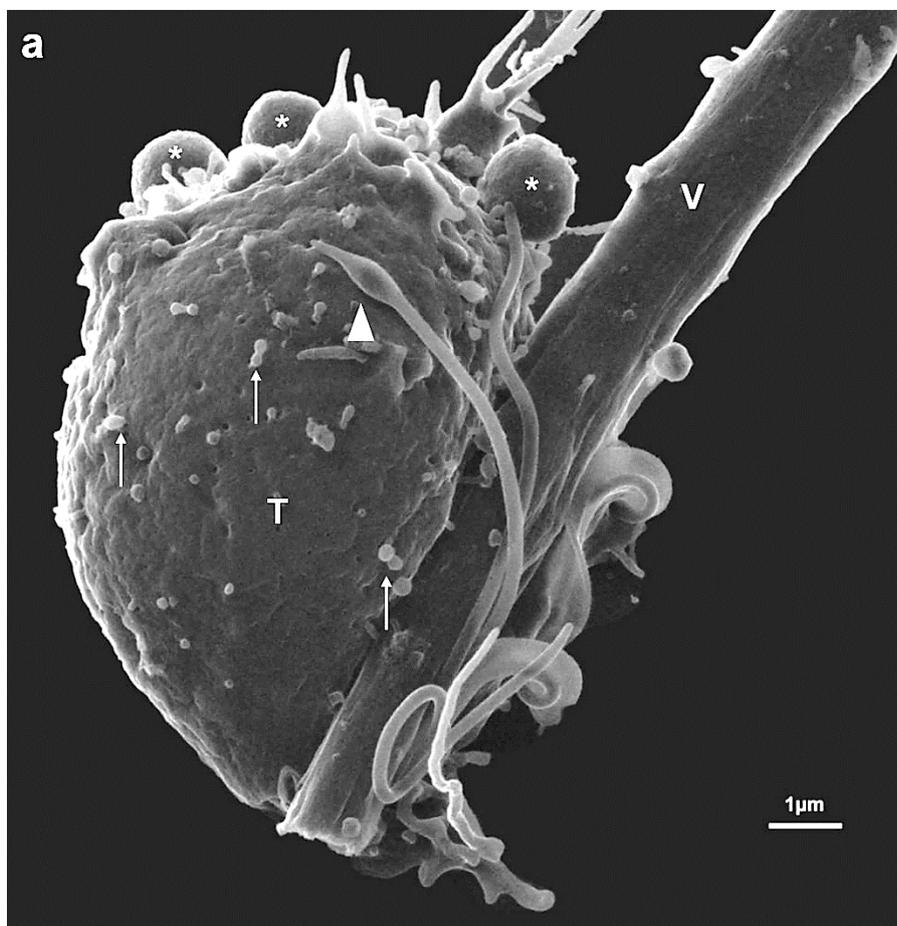
**Figura 28.** Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução da interação entre *T. vaginalis*, cepa 347, com células vaginais HMVII durante 30 minutos. Note que as tricomonas se encontram firmemente aderidas às células hospedeiras, e apresentam-se em forma amebóide. Nestas observações, podemos destacar a projeção de nanotubos livres (setas). T, *T. vaginalis*; V, célula vaginal.



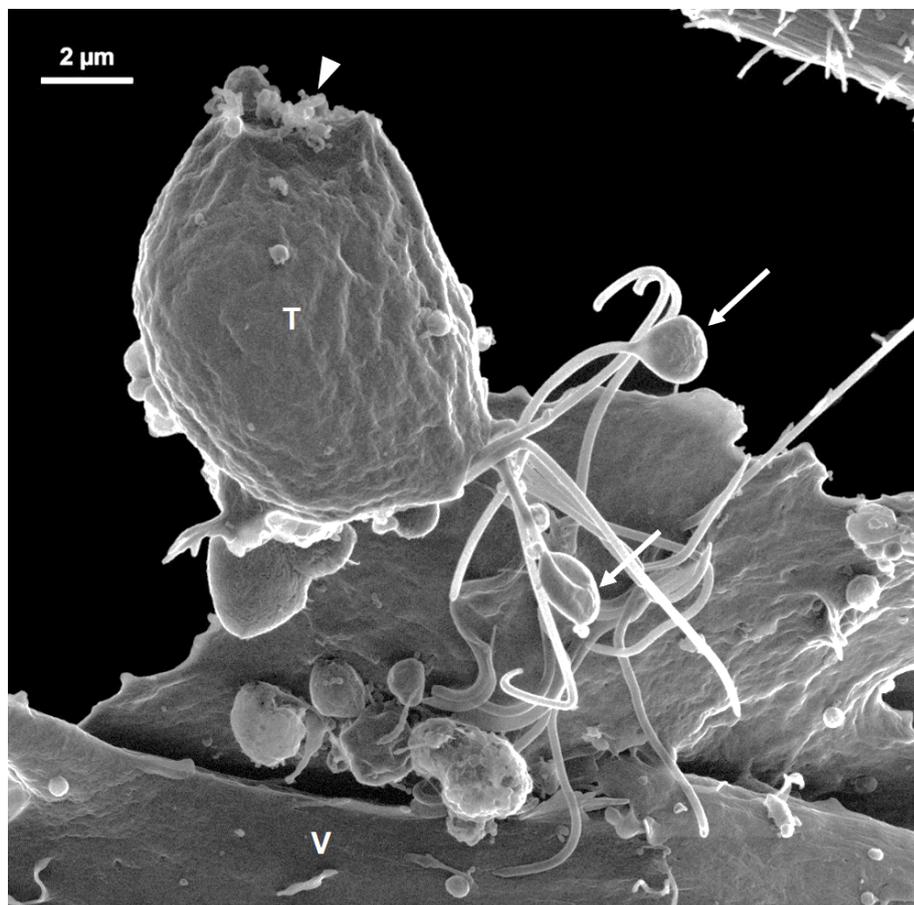
**Figura 29.** Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução após ensaio de interação entre *T. vaginalis*, cepa JT, com células epiteliais vaginais HMVII por 1 hora. Notamos que as tricomonas se encontram arredondadas e com seus flagelos aparentemente aderidos às células epiteliais. E, célula epitelial vaginal; T, *T. vaginalis*.



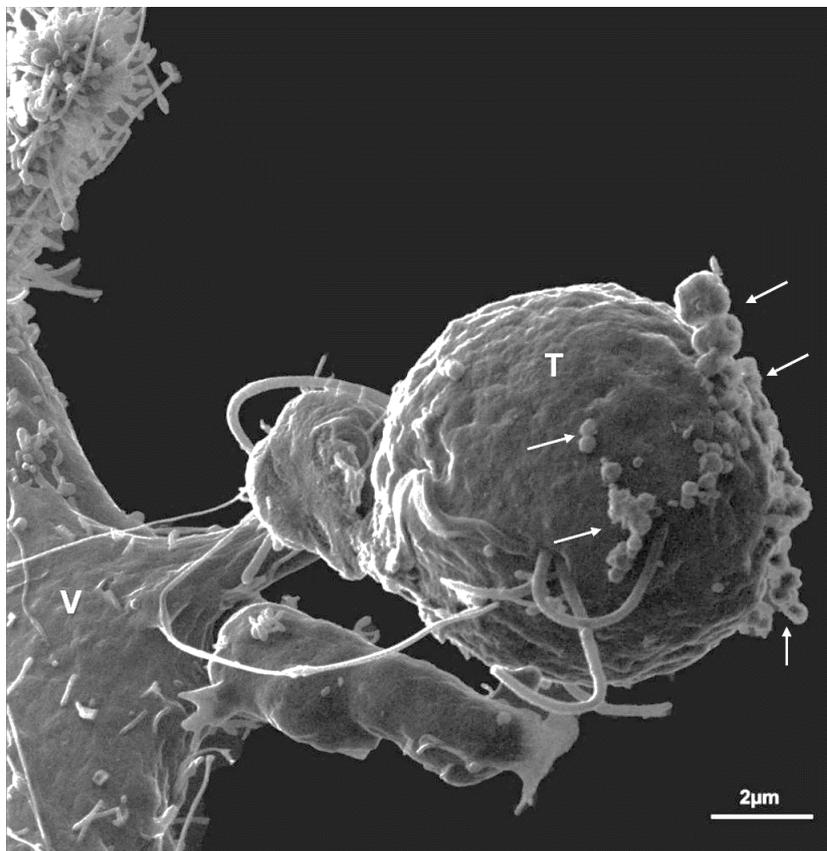
**Figura 30.** Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução após ensaio de interação entre *T. vaginalis* cepa 347 (T) com células epiteliais vaginais HMVII (E) por 1 hora. Nota-se as tricomonas aderidas às células epiteliais sem apresentar indícios de danos.



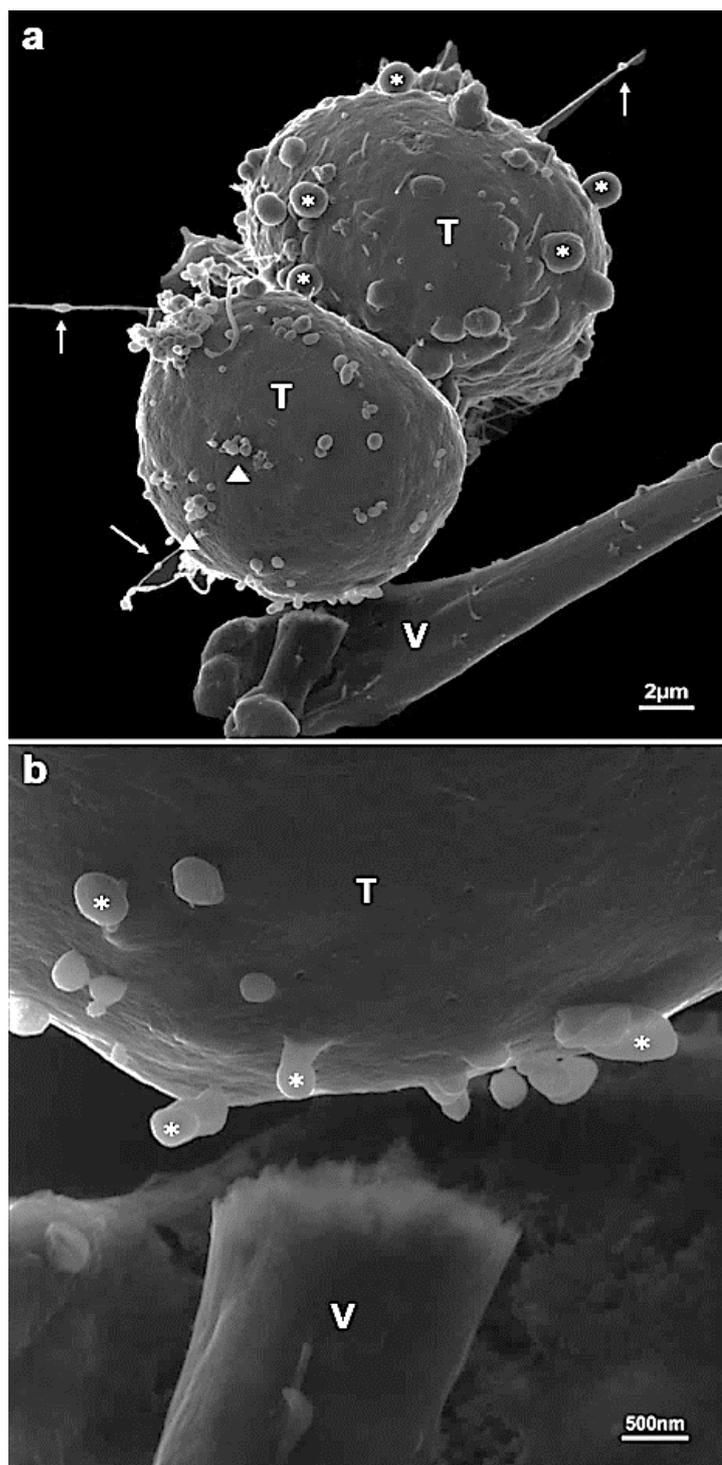
**Figura 31.** Microscopia de varredura de alta resolução com íons Hélio da interação de 1 hora entre *T. vaginalis* JT tratadas com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  por 10 minutos com células vaginais HMVII. Note a presença de pequenas (setas) e grandes (asteriscos) MVs aparentemente sendo liberadas da membrana plasmática e a intumescência na ponta do flagelo (cabeça de seta). T, *T. vaginalis*; V, célula vaginal.



**Figura 32.** Microscopia eletrônica de alta resolução com íons Hélio da interação por 1 hora entre *T. vaginalis*, cepa JT, tratada com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5μM de ionóforo de cálcio por 10 minutos e células vaginais HMVII. Note que algumas vesículas parecem estar sendo liberadas do parasita (cabeça de seta) e a intumescência na ponta do flagelo projetado (setas). T, *T. vaginalis*; V, célula vaginal.



**Figura 33.** Microscopia de varredura de íons Hélio do processo de interação por 1 hora entre *T. vaginalis*, cepa 347, tratada com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  por 10 minutos com células vaginais HMVII. Observe populações de MVs (setas) com diferentes diâmetros sendo liberadas pelo parasita. T, *T. vaginalis*; V, célula vaginal.



**Figura 34.** Microscopia de varredura de alta resolução com íons Hélio da interação de 1 hora entre *T. vaginalis*, cepa 347, tratada com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  + 4,5 $\mu\text{M}$  de ionóforo de cálcio por 10 minutos e células vaginais HMVII. **(a)** Visão geral da interação dos parasitas arredondados projetando estruturas finas, semelhantes a nanotubos, com dilatações evidentes (setas) e secretando MVs de tamanho heterogêneo (cabeça de seta e asteriscos); **(b)** Em maior aumento, é possível

observar a liberação de MVs (asteriscos) próximas às células hospedeiras. T, *T. vaginalis*; V, células vaginais.

## 6. DISCUSSÃO

O estudo da superfície celular de protozoários patogênicos tem despertado o interesse de vários grupos de pesquisa nos últimos anos. Ainda que a maioria dos grupos tem se dedicado a análises bioquímicas há iniciativas de análise utilizando microscopia eletrônica de varredura ou de ions (Revisão em DE SOUZA e MATTIAS, 2018). Por outro lado, há no momento grande interesse em se desvendar aspectos relacionados com o processo de comunicação intercelular com a participação de vesículas extracelulares liberadas pelos parasitas. Essas vesículas (VEs) foram descritas em todas as células eucarióticas e procarióticas como estruturas membranosas liberadas e carregadas com biomoléculas, incluindo ácidos nucléicos, glicoconjugados, lipídios e proteínas (RAPOSO e STORVOGEL, 2013; KALLURI e LEBLEU, 2020). Dois grupos principais de vesículas com biogênese e tamanho diferentes são considerados os mais predominantes: (1) exossomos (30-100 nm) originados de corpos multivesiculares e (2) microvesículas (100-1000 nm) originados da membrana plasmática (KALLURI e LEBLEU, 2020).

Estudos em protozoários patogênicos pertencentes à família Trypanosomatidae, onde temos patógenos do gênero *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, atualmente agrupados como TriTryps, evidenciaram que vesículas extracelulares participam ativamente durante a interação parasita-célula hospedeira, promovendo evasão do sistema imunológico e criando um ambiente que beneficia o parasita para o estabelecimento da infecção (KAYAMA e TAKEDA, 2010; GANNAVARAM et al., 2016; STIJLEMANS et al., 2016; DE SOUZA e BARRIAS, 2020; DANTAS-PEREIRA et al. 2021). Além disso, existem novas propostas para a aplicação translacional de VEs no tratamento, diagnóstico e imunização, para combater as doenças negligenciadas causadas por estes parasitas (ROSSI et al., 2021). Em protozoários parasitas anaeróbicos ou microaerófilos, como os patógenos humanos entéricos *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Blastocystis hominis* e parasitas do trato urogenital, como *T. vaginalis*, são capazes de sobreviver em um ambiente com privação de oxigênio. Mas, apesar de viverem em ambientes hostis, estes patógenos adotaram diferentes estratégias para sobreviver dentro dos hospedeiros, como a liberação de vesículas extracelulares (VEs) que tem se tornado uma atividade importante no estudo da

patogênese destes parasitas (HU et al., 2013; TWU et al., 2013; GAVINHO et al., 2020; SHARMA et al., 2020; SABATKE et al., 2021).

*T. vaginalis*, um parasita humano, causa a infecção não viral sexualmente transmissível mais prevalente em todo o mundo. Este patógeno secreta vesículas extracelulares que modulam sua interação com as células hospedeiras (TWU et al., 2013; OLMOS-ORTIZ, L. M. et al. 2017; NIEVAS et al., 2018; RAI e JOHNSON, 2019; ARTUYANTS et al., 2020). Em nosso trabalho desenvolvemos ensaios para estudar aspectos da biologia celular referentes aos processos de liberação das microvesículas de duas cepas de *T. vaginalis*, após estímulo com  $\text{CaCl}_2$  e ionóforo de cálcio, por se tratar de um campo ainda pouco explorado. A secreção dessas microvesículas gera diversas questões que ainda estão em estudo, tais como: (1) As *T. vaginalis* são capazes de secretar um número maior de vesículas na presença de cálcio? (2) Existem diferenças na morfologia destas vesículas? (3) No processo de interação com células vaginais os protozoários induzidos a secretar microvesículas apresentam maior patogenicidade?

A liberação de vesículas extracelulares por *T. vaginalis* já foi verificada previamente durante o contato com o hospedeiro (TWU et al., 2013; OLMOS-ORTIZ et al., 2017) e isoladas (NIEVAS et al., 2017). Twu et al. (2013) mostraram que exossomos são liberados e modulam as respostas imunes das células hospedeiras.

Devido ao desafio no estudo destas vesículas pela complexidade de sua biogênese e vasta heterogeneidade de tamanho, composição e origem, quando já estão liberadas, foi necessário desenvolver um arsenal de técnicas para detectá-las e caracterizá-las. Algumas se baseiam em suas propriedades biofísicas e no uso de marcadores moleculares e fluorescentes. Os procedimentos de detecção mais utilizados são *Western blotting*, análise de rastreamento em nanoescala e microscopia eletrônica (GARDINER et al., 2013). Em nosso trabalho usamos, além da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, a microscopia de alta resolução com íons Hélio e o DLS, tecnologias desenvolvidas para observações de estruturas em escala nanométrica e com capacidade de mensurar partículas em suspensão, respectivamente. A utilização do microscópio de varredura de íon Hélio aumenta significativamente a resolução de estruturas sub-nanométricas e tem se

mostrado uma excelente ferramenta para analisar algumas das estruturas mais ínfimas da célula. Oferece várias vantagens, incluindo melhor visualização de estruturas nanométricas de superfície, já que atinge uma resolução da ordem de 0.3 nm, maior profundidade de campo e um sistema de compensação de carga que permite a geração de imagens de amostras não condutoras, tornando esta modalidade de microscopia uma técnica de imagem de alta resolução altamente promissora (DE SOUZA e ATTÍAS, 2018; SCHMIDT et al., 2021). Por outro lado, as microvesículas e exossomos em suspensão sofrem movimento browniano, que se traduz em flutuações de dispersão de luz em uma fase líquida. Esta propriedade é medida pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), que fornece informações sobre o tamanho e a heterogeneidade da amostra de forma aprimorada (GANDHAM et al., 2020).

Nas nossas observações por microscopia eletrônica de varredura e com a microscopia de varredura de alta resolução com íons Hélio, observamos que as *T. vaginalis* produzem populações de vesículas extracelulares com tamanhos heterogêneos. Este evento ocorre de modo constitutivo, em células não tratadas, mas tem maior intensidade quando as células são incubadas na presença de  $\text{CaCl}_2$  e ionóforo de cálcio. Estes dados estão de acordo com estudos realizados em *T. vaginalis*, cepa B7RC2, tratadas com 1mM de  $\text{CaCl}_2$  para induzir a produção de MVs, que são liberados da membrana plasmática e dos flagelos do parasita (NIEVAS et al., 2017). Observamos, ainda, que células tratadas com cloreto de cálcio e ionóforo de cálcio produzem um maior número de MVs quando comparadas com células controle. Aqui cabe distinguir as vesículas que são observadas ainda na superfície celular daquelas efetivamente liberadas no meio extracelular. Em relação às primeiras, nossas observações apontam para um aumento significativo, da ordem de quatro vezes, quando é realizada a incubação com 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  por 10 minutos. No entanto, não observamos ampliação com a utilização do ionóforo de cálcio. Quando se analisa a produção de vesículas efetivamente liberadas, e que são avaliadas pelo DLS, os dados mostram um aumento crescente de liberação, mas também com pouca ampliação quando se utiliza o ionóforo.

Em outros sistemas celulares melhor caracterizados, o processo de liberação destas MVs conta com a colaboração da proteína VPS32, membro do complexo

ESCRTIII (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) que é responsável por mecanismos fundamentais na remodelação de membranas, pinçamento e liberação de microvesículas, como também descrito no hematozoário *Plasmodium falciparum* (AVALOS-PADILLA et al., 2021; COCERES et al., 2021) e em *T. vaginalis* (SALAS et al., 2022). Neste contexto, foi observado que parasitas que superexpressam VPS32 têm um aumento notável na aderência às células do hospedeiro, em comparação com os parasitas-controle, demonstrando um papel essencial para esta proteína na mediação das interações do parasita com as células do hospedeiro. Estes são mecanismos moleculares importantes, que fornecem informações sobre a biogênese das VEs, classificação de conteúdo e patogênese do parasita (SALAS et al., 2022).

Nossos resultados mostram que o aumento dos níveis de cálcio afeta a formação de MVs em *T. vaginalis*. Observamos que células tratadas com 4,5µM de ionóforo de cálcio liberam intensa quantidade de vesículas, inclusive com diâmetros maiores que as células-controle, assim como observado pelo tratamento com 1mM de CaCl<sub>2</sub>. Esta intensa liberação de MVs se dá pelo tratamento com ionóforo, sabendo que este composto pode desencadear o processo de fusão (LAKKARAJU e RODRIGUEZ-BOULAN, 2008), visto que o mecanismo de formação de MVs envolve a mobilização de cálcio intracelular com atividade de calpaína, ativação de scramblase e inibição de flippase (COCUCCI et al., 2009; CAMUSSI et al., 2010). Semelhante a isso, foi visto em *Giardia duodenalis* que quando o protozoário é incubado na presença de cálcio existe o estímulo a secretar microvesículas e exossomos (EVANS-OSES et al., 2017).

O uso do ionóforo de cálcio com o objetivo de facilitar a entrega de cálcio para as células é pouco explorado em protozoários patogênicos. Em *T. cruzi* resultados semelhantes foram observados, sabendo que o nível de cálcio intracelular estimula a liberação de VEs, as células foram tratadas com ionóforo de cálcio e houve um aumento na liberação de VEs (SAVINA et al., 2003; CRONEMBERGER-ANDRADE et al., 2020). Cientes que a mobilização de cálcio intracelular é necessária para a biogênese de MVs da membrana plasmática, o composto foi utilizado para estudar o efeito do aumento do cálcio intracelular na vesiculação dos parasitas. Visto que o ionóforo ativa canais de cálcio, mobiliza complexos da membrana plasmática e

cálcio a partir do retículo endoplasmático (TAYLOR et al., 2020). Assim como observado o arredondamento em células de mamíferos que foram tratadas por períodos prolongados com o ionóforo de cálcio (JAISWAL, ANDREWS e SIMON, 2002), em nossas análises verificamos também que as tricomonas tratadas por 20 minutos com o ionóforo de cálcio adquirem uma morfologia mais arredondada que a típica piriforme encontrada em culturas axênicas ou assumem formas de pseudocistos. A presença destas formas esféricas com flagelos internalizados, denominados pseudocistos ou formas endoflagelares, têm sido comumente encontrados nesses parasitas (LIPMAN et al. 1999; GRANGER et al. 2000; PEREIRA-NEVES et al., 2012; DA COSTA e BENCHIMOL 2004, RIBEIRO et al. 2015; CASTRO et al. 2016). Os pseudocistos são observados principalmente em condições desfavoráveis ou de muito estresse provocado por drogas ou de privação de nutrientes e, em baixa proporção, em condições de cultura axênica in vitro (PEREIRA-NEVES et al., 2003). Embora o pseudocisto de *T. vaginalis* tenha sido definido, estudos mais profundos ainda se fazem necessários (PEREIRA-NEVES et al., 2003; HUSSEIN e ATWA, 2008 ; AFZAN e SURESH, 2012; DIAS-LOPES et al., 2017).

Em nosso trabalho observamos também a formação de intumescências na ponta dos flagelos de ambas as cepas de *T. vaginalis* de culturas axênicas e em ensaios de interação. Estes detalhes foram observados com maior frequência em células que foram tratadas com cálcio. Estas estruturas se assemelham com estruturas extra-axonemais (EAS), recentemente elucidadas morfológica e funcionalmente em *T. vaginalis* e *T. foetus* (COCERES et al., 2021). A membrana destas EAS possui um alto número de partículas intramembranas e a presença destas formam rosetas circulares na membrana dos flagelos anteriores das tricomonas (BENCHIMOL et al., 1981; BENCHIMOL e DE SOUZA, 1990). Essas partículas de membrana poderiam estar envolvidas na detecção ativa do ambiente extracelular e desempenhar um papel fundamental no controle dos níveis locais de cálcio para regular o batimento flagelar (BENCHIMOL, 2004; LENAGHAN et al., 2014). A presença de cálcio forneceria um maior controle e motilidade para as células, auxiliando nas interações patógeno-hospedeiro e para atividades

metabólicas que podem participar da transferência de energia dentro do flagelo (GINGER et al., 2013; SHAW et al., 2019; ZHANG et al., 2021).

Durante as periódicas observações do processo de interação das tricomonas com células vaginais, também notamos a projeção de estruturas semelhantes a nanotubos de tunelamento, no processo de interação e em células livres conectando entre si. Os nanotubos são estruturas de membrana tubular com diâmetro médio de 70nm, que variam em comprimento, forma, contêm F-actina e, geralmente, proteínas de adesão em uma das extremidades (HAN e WANG, 2021). Observações por microscopia de alta resolução se faz importante, visto que suas características morfológicas os tornam diferentes de outras protrusões celulares, como filópodos e citonemas (DE SOUZA e BARRIAS, 2020; HAN e WANG, 2021). Estas estruturas podem surgir de forma espontânea, como observado em *T. foetus* (BENCHIMOL et al., 2021), mas também é proposto que o aumento da concentração de cálcio intracelular e do trânsito do mesmo para células vizinhas estimule a fina projeção de membrana (SMITH, SHUAI e PARKER, 2011; LOCK, PARKER e SMITH, 2016).

Observamos também algumas dilatações no decorrer destes nanotubos, sugerindo que houvesse material em trânsito, o que é mais favorável para o transporte de organelas maiores e vesículas de diferentes origens (ONFELT et al., 2006). Os nanotubos também permitem a transferência de pequenas moléculas, proteínas e organelas entre as células (KOLBA et al., 2019). Portanto, os TNT serviriam como uma forma de comunicação entre células a longa distância na forma de condutos celulares diretos, sendo considerados distintos de outros mediadores da comunicação célula-célula ou fatores parácrinos que são secretados (FREI et al., 2015). Outro dado relacionado a comunicação dependente de TNT é a disseminação de substâncias infecciosas (JANSENS et al., 2020). A transferência de moléculas é um fator determinante no transporte de antígenos infecciosos, mas, nos últimos anos, foram descritos que vírus de muitas famílias, incluindo retrovírus, herpesvírus e ortomixovírus, disseminaram-se via nanotubos (KUMAR et al., 2017; PANASIUK et al., 2018; JANSENS et al., 2020). Além de vírus, micoplasma, bactérias e parasitas causadores da malária também se propagaram por meio de TNTs (ONFELT et al., 2006; RUPP et al., 2019; KIM et al., 2019).

As VEs são atualmente um foco de intenso interesse na compreensão de seu papel na comunicação intercelular, disseminação de moléculas bioativas e sua contribuição na progressão de doenças. Embora os TNTs sejam comparativamente menos descritos, eles possuem um grande potencial não apenas no estudo da comunicação celular, mas também em seus papéis multifacetados na progressão de doenças (NAWAZ e FATIMA, 2017). Embora estruturas como exossomos, ectossomos, citonemas e nanotubos tenham sido observadas por muitos anos, apenas mais recentemente foram reconhecidas como participantes de processos da comunicação célula-célula. Até recentemente, a participação na comunicação era, geralmente, considerada como ocorrendo exclusivamente em junções comunicantes e em processos secretores nos quais os mediadores são liberados nas proximidades dos receptores (DE SOUZA e BARRIAS, 2020). Desse modo, sua presença em tricomonas confere uma área de grande interesse e que pode ter relação com o grau de patogenicidade do parasita e sua comunicação com a célula hospedeira.

## 7. CONCLUSÕES

- A utilização de microscópios de varredura de alta resolução e a boa preservação dos parasitas durante o processamento das amostras favoreceu a observação de estruturas nanométricas, como as microvesículas e exossomos, além de detalhes das células que, aparentemente, estariam liberando estas vesículas.
- O estímulo com  $\text{CaCl}_2$  estimulou a produção de microvesículas em ambas as cepas, JT e 347, de *T. vaginalis*, essa liberação foi dependente do estímulo e tempo de tratamento;
- O ionóforo de cálcio também estimula, ainda que em menor intensidade, a liberação de microvesículas. Contudo, células arredondas e pseudocistos foram observados em períodos de tratamento prolongado;
- Em estudos relacionados com a formação de microvesículas é importante analisar o que se passa na superfície celular, o que pode ser feito usando microscopia de varredura de alta resolução, com o que é efetivamente liberado e que pode ser analisado tanto usando o DLS como constatação negativa do sobrenadante.
- *T. vaginalis* projeta nanotubos. Em nossas observações utilizando modernas técnicas de microscopia eletrônica de varredura, encontramos nanotubos com uma possível presença de material em vias de transporte, sugerindo mais um mecanismo que o parasito, provavelmente, utilizaria para ter sucesso como agente infectivo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADMYRE, C., JOHANSSON, S. M., QAZI, K. R., FILÉN, J-J., LAHESMAA, R., NORMAN, M., NEVE E. P. A., SCHEYNIUS, A., GABRIELSSON, S. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. **The Journal of Immunology**, 179, 1969-1978, 2007. DOI: 10.4049/jimmunol.179.3.1969
- RAFFONSO, A. L., BENCHIMOL, M., RIBEIRO, K. C., LINS, U., DE SOUZA, W. Further studies on the endocytic activity of *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, 80, 403-413, 1994. DOI: 10.1007/BF00932378
- AFFONSO, A. L.; DE ALMEIDA, J. C.; BENCHIMOL, M. Partial characterization of cytoplasmic compartments involved in the endocytic process of *Tritrichomonas foetus*. **European Journal of Cell Biology**, 72, 247-256, 1997.
- ALDERETE, J. F., WENDEL, K. A., ROMPALO, A. M., ERBELDING, E. J., BENCHIMOL, M., CHANG T-H. *Trichomonas vaginalis*: evaluating capsid proteins of dsRNA viruses and the dsRNA virus within patients attending a sexually transmitted disease clinic. **Experimental Parasitology**, 103, 44-50, 2003. DOI: 10.1016/s0014-4894(03)00068-7.
- ALDERETE, J. F., GARZA, G. E. Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. **Infection and Immunity**, 56, 28-33, 1988. DOI: 10.1128/iai.56.1.28-33.1988.
- ALDERETE, J. F., LEHKER, M. W., ARROYO, R. The mechanisms and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology Today**, 11, 70-74, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(95\)80122-7](https://doi.org/10.1016/0169-4758(95)80122-7).
- ALDERETE, J. F., PEARLMAN, E. Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. **Sexually Transmitted Infections**, 60, 99-105, 1984. DOI: 10.1136/sti.60.2.99.
- ALDERETE, J. F., PROVENZANO, D., LEHKER, M. W. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. **Microbial Pathogenesis**, 19, 93-103, 1995. DOI: 10.1006/mpat.1995.0049.
- ALESSIO, C., NYIRJESY, P. Management of resistant trichomoniasis. **Current Infectious Disease Reports**, 21, 1-7, 2019. DOI: 10.1007/s11908-019-0687-4
- AMOS, W. B., GRIMSTONE, A. V., ROTHSCHILD, L. J., ALLEN, R. D. Structure, protein composition and birefringence of the costa: a motile flagellar root fibre in the flagellate *Trichomonas*. **Journal of Cell Science**, 35, 139-164, 1979.
- AQUINO, M. F. K., HINDERFELD, A. S., SIMOES-BARBOSA, A. *Trichomonas vaginalis*. **Trends in Parasitology**. 36, 646-647, 2020. DOI: 10.1016/j.pt.2020.01.010
- ARROYO, R. e ALDERETE, J. F. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. **Infection and Immunity**, 57, 2991-2997, 1989.

ARTUYANTS, Anastasiia et al. Extracellular vesicles produced by the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis* contain a preferential cargo of tRNA-derived small RNAs. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 14, p. 1145-1155, 2020.

ATAYDE, V. D., SUAU H. A., TOWNSEND, S., HASSANI, K., KAMHAWI, S., OLIVIER, M. Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. **Cell Reports**, 13, 957-967, 2015. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.09.058.

AUSTEFJORD, M. W.; GERDES, H-H.; WANG, X. Tunneling nanotubes: Diversity in morphology and structure. **Communicative & Integrative Biology**, 7, e27934, 2014. DOI: 10.4161/cib.27934.

BADMAN, S. G., VALLELY, L. M., TOLIMAN, P., KARIWIGA, G., LOTE, B., POMAT, W., HOLMER, C., GUY, R., LUCHTERS, S., MORGAN, C., GARLAND, S. M., TABRIZI, S., WHILEY, D., ROGERSON, S. J., MOLA, G., WAND, H., DONOVAN, B., CAUSER, L., KALDOR, J., VALLELY, A. A novel point-of-care testing strategy for sexually transmitted infections among pregnant women in high-burden settings: results of a feasibility study in Papua New Guinea. **BMC Infectious Diseases**, 16, 1-6, 2016. DOI: 10.1186/s12879-016-1573-4.

BANDEIRA, P. T., DE SOUZA, W. Costain 1 (ARM19800. 1)-The first identified protein of the costa of the pathogenic protozoan *Tritrichomonas foetus*. **Experimental Parasitology**, 232, 108177, 2022. DOI: 10.1016/j.exppara.2021.108177.

BEAL, C., GOLDSMITH, R., KOTBY, M., SHERIF, M., EL-TAGI, A., FARID, A., ZAKARIA, S., EAPEN, J. The plastic envelope method, a simplified technique for culture diagnosis of trichomoniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, 30, 2265-2268, 1992. DOI: 10.1128/jcm.30.9.2265-2268.1992

BÉNARD, M., SCHAPMAN, D., LEBON, A., MONTERROSO, B., BELLENGER, M., LE FOLL, F., PASQUIER J., VAUDRY, H., VAUDRY, D., GALAS, L. Structural and functional analysis of tunneling nanotubes (TNTs) using gCW STED and gconfocal approaches. **Biology of the Cell**, 107, 419-425, 2015. DOI: 10.1111/boc.201500004

BENCHIMOL, M. Hydrogenosome autophagy: an ultrastructural and cytochemical study. **Biology of the Cell**, 91, 165-174, 1999. DOI: 10.1016/s0248-4900(99)80039-2

BENCHIMOL, M., RIBEIRO, K. C., MARIANTE, R. M., ALDERETE, J. F. Structure and division of the Golgi complex in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **European Journal of Cell Biology**, 80, 593-607, 2001. DOI: 10.1078/0171-9335-00191

BENCHIMOL, M. Hydrogenosome morphological variation induced by fibronectin and other drugs in *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. **Parasitology Research**, 87, 215-222, 2001. DOI: 10.1007/s004360000329

BENCHIMOL, M. New ultrastructural observations on the skeletal matrix of *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, 97, 408-416, 2005. DOI: 10.1007/s00436-005-1480-x

BENCHIMOL, M. The Hydrogenosome as a Drug Target. **Current Pharmaceutical Design**, 14, 872-881, 2008. DOI: 10.2174/138161208784041114

BENCHIMOL, M. Trichomonads under microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, 10, 528-550, 2004. DOI: 10.1017/S1431927604040905

BENCHIMOL, M., DA CUNHA E SILVA, N.L., ELIAS, C.A., DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*: ultrastructure and cytochemistry of endocytosis. **Experimental Parasitology**, 62, 405-415, 1986. DOI: 10.1016/0014-4894(86)90049-4

BENCHIMOL, M.; BATISTA, C.; DE SOUZA, W. Fibronectin-and laminin-mediated endocytic activity in the parasitic protozoa *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, 22, 39-45, 1990.

BENCHIMOL, M., BERNARDINO, M. Ultrastructural localization of glycoconjugates in *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, 88, 134-143, 2002. DOI: 10.1007/s004360100466

BENCHIMOL, M., DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*: cytochemical visualization of the endoplasmic reticulum-Golgi complex and lipids. **Experimental Parasitology**, 59, 51-58, 1985. DOI: 10.1016/0014-4894(85)90056-6

BENCHIMOL, M., DINIZ, J. A. P., RIBEIRO, K. The fine structure of the axostyle and its associations with organelles in Trichomonads. **Tissue and Cell**, 32, 178-187, 2000. DOI: 10.1054/tice.2000.0102

BENCHIMOL, M.; ELIAS, C. A.; DE SOUZA, W. Specializations in the flagellar membrane of *Tritrichomonas foetus*. **The Journal of Parasitology**, 174-178, 1981.

BENCHIMOL, M., ELIAS, C. A., DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*: Fine Structure of Freeze-Fractured Membranes. **The Journal of Protozoology**, 29, 348-353, 1982. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1982.tb05413.x

BENCHIMOL, M., ELIAS, C. A., DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*: ultrastructural localization of basic proteins and carbohydrates. **Experimental Parasitology**, 54, 135-144, 1982. DOI: 10.1016/0014-4894(82)90120-5

BENCHIMOL, M., ELIAS, C. A., DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*: ultrastructural localization of calcium in the plasma membrane and in the hydrogenosome. **Experimental Parasitology**, 54, 277-284, 1982. DOI: 10.1016/0014-4894(82)90036-4

BENCHIMOL, M., JOHNSON, P. J., DE SOUZA, W. Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study. **Biology of the Cell**, 87, 197-205, 1996. DOI: 10.1111/j.1768-322X.1996.tb00981.x

BENCHIMOL, M., KACHAR, B., SOUZA, W. Surface domains in the pathogenic protozoan *Tritrichomonas foetus*. **The Journal of Protozoology**, 39, 480-484, 1992. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1992.tb04835.x

BENCHIMOL, M., PEREIRA NETO, A., MIRANDA-MAGALHAES, A., DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*: new structures by high-resolution scanning helium ion microscopy. **Intech Biocell**, 2, 23, 2021. DOI: 10.32604/biocell.2021.014599

BENCHIMOL, M., SOUZA, W. Fine Structure and Cytochemistry of the Hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus* 1. **The Journal of Protozoology**, 30, 422-425, 1983. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1983.tb02942.x

BENCHIMOL, M., MONTEIRO, S., CHANG, T-H., ALDERETE, J. F. Virus in *Trichomonas*-an ultrastructural study. **Parasitology International**, 51, 293-298, 2002. DOI: 10.1016/s1383-5769(02)00016-8

BOBRIE, A., COLOMBO, M., RAPOSO, G., THÉRY, C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. **Traffic**, 12, 1659-1668, 2011. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x

BOSSERMAN, E. A., HELMS, D. J., MOSURE, D. J. SECOR, W. E., WORKOWSKI, K. A. Utility of antimicrobial susceptibility testing in *Trichomonas vaginalis*-infected women with clinical treatment failure. **Sexually Transmitted Diseases**, 38, 983-987, 2011. DOI: 10.1097/OLQ.0b013e318224db39

BOUCHEMAL, K., BORIES, C., LOISEAU, P. M. Strategies for prevention and treatment of *Trichomonas vaginalis* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, 30, 811-825, 2017. DOI: 10.1128/CMR.00109-16

BRUGEROLLE, G., VISCOGLIOSI, E. Organization and composition of the striated roots supporting the Golgi apparatus, the so-called parabasal apparatus, in parabasalid flagellates. **Biology of the Cell**, 81, 277-285, 1994.

BUI E. T., BRADLEY, P. J., JOHNSON, P. J. A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 93, 9651-9656, 1996. DOI: 10.1073/pnas.93.18.9651

CAVALIER-SMITH, T. Kingdom protozoa and its 18 Phyla. **Microbiology Review**, 57, 953-994, 1993. DOI: 10.1128/mr.57.4.953-994.1993

CLEMENS, D. L., JOHNSON, P. J. Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 307-313, 2000. DOI: 10.1016/s0166-6851(99)00220-0

COCERES, V. M., IRIARTE, L. S., MIRANDA-MAGALHÃES, A., ANDRADE, T. A. S., MIGUEL, N., PEREIRA-NEVES, A. Ultrastructural and Functional Analysis of a Novel Extra-Axonemal Structure in Parasitic Trichomonads. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 1101, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.757185

COLEMAN, J. S., GAYDOS, C. A., FRANK, W. *Trichomonas vaginalis* Vaginitis in Obstetrics and Gynecology Practice: New Concepts and Controversies. **Obstetrical Gynecological Survey**, 68, 43–50, 2013. DOI: 10.1097/OGX.0b013e318279fb7d

COSTA E SILVA FILHO, F. C., DE SOUZA, W., LOPES, J. D. Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences**, 85, 8042-8046, 1988. DOI: 10.1073/pnas.85.21.8042

CROUCH, M. L., ALDERETE, J. F. *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin. **Microbiology**, 145, 2835-2843, 1999. DOI: 10.1099/00221287-145-10-2835

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**, 17, 783-793, 2004. DOI: 10.1128/CMR.17.4.783-793.2004.

DANTAS-PEREIRA, L., MENNA-BARRETO, R., & LANNES-VIEIRA, J. Extracellular Vesicles: Potential Role in Remote Signaling and Inflammation in *Trypanosoma cruzi*-Triggered Disease. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 9, 798054, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.798054>

DE ANDRADE ROSA, I., EINICKER-LAMA, M., BERNARDO, R. R., PREVIATTO, L. M., MOHANA-BORGES, R., MORGADO-DÍAZ, J. A., BENCHIMOL, M. Cardiolipin in hydrogenosomes: evidence of symbiotic origin. **Eukaryotic Cell**, 5, 784-787, 2006. DOI: 10.1128/EC.5.4.784-787.2006

DE ANDRADE ROSA, I., CARUSO, M. B., SANTOS, E. O., GONZAGA, L., ZINGALI, R. B., VASCONCELOS, A. T. R., DE SOUZA, W., BENCHIMOL, M. The costa of trichomonads: A complex macromolecular cytoskeleton structure made of uncommon proteins. **Biology of the Cell**, 109, 238-253, 2017. DOI: 10.1111/boc.201600050

DE ANDRADE ROSA, I., DE SOUZA, W., BENCHIMOL, M. Changes in the structural organization of the cytoskeleton of *Tritrichomonas foetus* during trophozoite-pseudocyst transformation. **Micron**, 73, 28-35, 2015. DOI: 10.1016/j.micron.2015.03.008

DE JESUS, J. B., CUERVO, P., JUNQUEIRA, M., BRITTO, C., COSTA E SILVA-FILHO, F., SOARES, M. J., CUPOLILLO, E., FERNANDES, O., DOMONT, G. B. A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. **Proteomics**, v. 7, n. 12, p. 1961-1972, 2007. DOI: 10.1002/pmic.200600797

DE SOUZA, W., BARRIAS, E. S. Membrane-bound extracellular vesicles secreted by parasitic protozoa: cellular structures involved in the communication between cells. **Parasitology Research**, v. 119, n. 7, 2020. DOI: 10.1007/s00436-020-06691-7

DIAMOND, L. S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **The Journal of Parasitology**, 43, 488-490, 1957.

DIAS-LOPES, G., SABOIA-VAHIA L., MARGOTTI, E. T., FERNANDES N. S., CASTRO, C. L. F., JUNIOR, F. O. O., PEIXOTO, J. F., BRITTO, C., COSTA E SILVA FILH, F., CUERVO, P., DE JESUS, J. B. Morphologic study of the effect of iron on pseudocyst formation in *Trichomonas vaginalis* and its interaction with human epithelial cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 112, 664-673, 2017. DOI: 10.1590/0074-02760170032

RYAN, C. M., DE MIGUEL, N., JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis*: current understanding of host–parasite interactions. **Essays in Biochemistry**, 51, 161-175, 2011. DOI: 10.1042/bse0510161

DOLEZAL, P., SMÍD, O., RADA, P., ZUBÁCOVÁ, Z., BURSA, D., SUTÁK, R., NEBESÁROVÁ, J., LITHGOW, T., TACHEZY, J. *Giardia* mitochondria and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 102, 10924-10929, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0500349102

DONNÉ, A. animalcules observés dans les matières purulentes et le produit des sécrétions des organes génitaux de l'homme et de la femme. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, 3, 385-386, 1836.

DUNNE, R. L. et al. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. **Cell Research**, 13, 239-249, 2003. DOI: 10.1038/sj.cr.7290169

EMBLEY, M. et al. Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 358, 191-203, 2003. DOI: 10.1098/rstb.2002.1190

FERNÁNDEZ-MARTÍN, K. G. et al. Genome-wide identification, in silico characterization and expression analysis of ZIP-like genes from *Trichomonas vaginalis* in response to Zinc and Iron. **Biometals**, v. 30, n. 5, p. 663-675, 2017. DOI: 10.1007/s10534-017-0034-x

FICHOROVA, R. N. Impact of *Trichomonas vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. **Journal of Reproductive Immunology**, 83, 185-189, 2009. DOI: 10.1016/j.jri.2009.08.007

FICHOROVA, R. N. et al. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan exploits binding to galectin-1 and -3 to modulate epithelial immunity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 2, p. 998-1013, 2016. DOI: 10.1074/jbc.M115.651497

FIORI, P. L. et al. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. **Microbial Pathogenesis**, 20, 109-118, 1996. DOI: 10.1006/mpat.1996.0010

FIORI, P. L.; RAPPELLI, P.; ADDIS, M. F. The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. **Microbes and Infection**, 1, 149-156, 1999. DOI: 10.1016/s1286-4579(99)80006-9

FRANCIOLI, P. et al. Phagocytosis and killing of *Neisseria gonorrhoeae* by *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Infectious Diseases**, 147, 87-94, 1983. DOI: 10.1093/infdis/147.1.87

FREI, D. M., HODNELAND, E., RIOS-MONDRAGON, I., BURTEY, A., NEUMANN, B., BULKESCHER, J., SCHÖLERMANN, J., PEPPERKOK, R., GERDES, H. H., KÖGEL, T. Novel microscopy-based screening method reveals regulators of contact-

dependent intercellular transfer. **Scientific Reports**, 5, 1-18, 2015. DOI: 10.1038/srep12879.

FYKERUD, T. A., KNUDSEN, L. M., TOTLAND, M. Z., SORENSEN, V., S., LOTHE, R.A., BRECH, A., LEITHE, E. Mitotic cells form actin-based bridges with adjacent cells to provide intercellular communication during rounding. **Cell Cycle**, 15, 2943-2957, 2016. DOI: 10.1080/15384101.2016.1231280

GARBER, G. E. The laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, 16, 35-38, 2005. DOI: 10.1155/2005/373920

GARCIA, A. F., CHANG, T. H., BENCHIMOL, M., KLUMPP, D.J., LEHKER, M. W., ALDERETE, J. F. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1207-1224, 2003. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03366.x.

GARRETT, N. J., OSMAN, F., MAHARAJ, B., NAICKER, N., GIBBS, A., NORMAN, E., SAMSUNDER, N., NGOBESE, H., MITCHEV, N., SINGH, R., ABDOOL KARIM, S. S., KHARSANY, A. B. M., MLISANA, K., ROMPALO, A., MINDEL, A. Beyond syndromic management: opportunities for diagnosis-based treatment of sexually transmitted infections in low-and middle-income countries. **PloS One**, 13, e0196209, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0196209

GILBERT, R. O., ELIA, G., BEACH, D. H., KLAESSIG, S., SINGH, B. N. Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. **Infection and Immunity**, 68, 4200-4206, 2000. DOI: 10.1128/IAI.68.7.4200-4206.2000

GONZÁLEZ-ROBLES, A., LÁZARO-HALLER, A., ESPINOSA-CANTELLANO, M., ANAYA-VELÁZQUEZ, F., MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Trichomonas vaginalis*: ultrastructural bases of the cytopathic effect. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 42, 641-651, 1995. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1995.tb05921.x

GRANGER B. L., WARWOOD, S. J., BENCHIMOL, M., DE SOUZA, W. Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, 86, 699-709, 2000. DOI: 10.1007/pl00008555

GRAVES K. J, GHOSH A. P., KISSINGER, P. J., MUZNY, C. A. *Trichomonas vaginalis* virus: a review of the literature. **International Journal of STD & AIDS**, 30, 496-504, 2019. DOI: 10.1177/0956462418809767

GRAVES K. J., GHOSH, A. P., SCHMIDT, N., AUGOSTINI, P., SECOR, W. E., SCHWEBKE, J. R., MARTIN, D. H., KISSINGER, P. J., MUZNY, C. A. *Trichomonas vaginalis* virus among women with trichomoniasis and associations with demographics, clinical outcomes, and metronidazole resistance. **Clinical Infectious Diseases**, 69, 2170-2176, 2019. DOI: 10.1093/cid/ciz146

GUNGOR-ORDUERI, N. E., CELIK-OZENCI, C., CHENG, C. Y. Ezrin: a regulator of actin microfilaments in cell junctions of the rat testis. **Asian Journal of Andrology**, 17, 653, 2015. DOI: 10.4103/1008-682X.146103

GURKE, S., BARROSO, J. F. V., GERDES, H-H. The art of cellular communication: tunneling nanotubes bridge the divide. **Histochemistry and Cell Biology**, 129, 539-550, 2008. DOI: 10.1007/s00418-008-0412-0

HARDING, C., HEUSER, J., STAHL, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. **The Journal of Cell Biology**, 97, 329-339, 1983. DOI: 10.1083/jcb.97.2.329

HARP, D. F., CHOWDHURY, I. Trichomoniasis: evaluation to execution. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, 157, 03-09, 2011. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2011.02.024

HASHEMI, N., OMMI, D., KHEYRI, P., KHAMESIPOUR, F., SETZER, W. N., BENCHIMOL, M. A review study on the anti-*trichomonas* activities of medicinal plants. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 2021. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2021.01.002

HASSANI, S., ASGHARI, G., YOUSEFI, H., KAZEMIAN, A., RAFIEIEAN, M., DARANI, H. Y. Effects of different extracts of *Eucalyptus camaldulensis* on *Trichomonas vaginalis* parasite in culture medium. **Advanced Biomedical Research**, 2, 2013. DOI: 10.4103/2277-9175.114187

HE, D., PENGTAO, G., JU, Y., JIANHUA, L., HE, L., GUOCAI, Z., XICHEN, Z. Differential protein expressions in virus-infected and uninfected *Trichomonas vaginalis*. **The Korean Journal of Parasitology**, 55, 121, 2017. DOI: 10.3347/kjp.2017.55.2.121

HELMS, D. J., MOSURE, D. J., SECOR, W. E., WORKOWSKI, K. A. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 198, 370, 2008. DOI: 10.1016/j.ajog.2007.10.795

HIRT, R. P. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. **Sexually Transmitted Infections**, 89, 439-443, 2013. DOI: 10.1136/sextrans-2013-051105

HIRT, R. P., DE MIGUEL, N., NAKJANG, S., DESSI, D., LIU, Y. C., DIAZ, N., RAPPELLI, P., ACOSTA-SERRANO, A., FIORI, P. L., MOTTRAM, J. C. *Trichomonas vaginalis* pathobiology: new insights from the genome sequence. **Advances in Parasitology**, v. 77, p. 87-140, 2011. DOI: 10.1016/B978-0-12-391429-3.00006-X

HOBBS, M. M., SEÑA, A. C. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. **Sexually Transmitted Infections**, v. 89, n. 6, p. 434-438, 2013. DOI: 10.1136/sextrans-2013-051057

HONIGBERG, B. M., BRUGEROLLE, G. Structure. In: Honigberg BM. **Trichomonads Parasitic in Humans**. New York: Springer-Verlag, 5-35, 1990.

HONIGBERG, B. M., MATTERN, CARL F. T., DANIEL, W. A. Fine structure of the mastigont system in *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller). **The Journal of Protozoology**, 18, 183-198, 1971. DOI: DOI: 10.1111/j.1550-7408.1971.tb03306.x

Horváthová, L., Šafaríková, L., Basler, M., Hrdy, I., Campo, N. B., Shin, J. W., Huang, K. Y., Huang, P. J., Lin, R., Tang, P., e Tachezy, J. Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *Trichomonas vaginalis* genome. **Genome Biology and Evolution**, 4, 1017-1029, 2012. DOI: 10.1093/gbe/evs078

HSU, H. M., HUANG, Y. H., ARYAL, S., LIU, H. W., CHEN, C., CHEN, S. H., CHU, C. H., TAI, J. H. Endomembrane Protein Trafficking Regulated by a Tv Cyp2 Cyclophilin in the Protozoan Parasite, *Trichomonas vaginalis*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-58270-6

HSU, H. M., CHU, C. H., WANG, Y. T., LEE, Y., WEI, S. Y., LIU, H. W., ONG, S. J., CHEN, C., TAI, J. H. Regulation of nuclear translocation of the Myb1 transcription factor by TvCyclophilin 1 in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Biological Chemistry**, 289, 19120-19136, 2014. DOI: 10.1074/jbc.M114.549410

HSU, H. M., LEE, Y., HSU, P. H., LIU, H. W., CHU, C. H., CHOU, Y. W., CHEN, Y. R., CHEN, S. H., TAI, J. H. Signal transduction triggered by iron to induce the nuclear importation of a Myb3 transcription factor in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Biological Chemistry**, 289, 29334-29349, 2014. DOI: 10.1074/jbc.M114.599498

HSU, H. M., ONG, S. J., LEE, M. C., TAI, J. H. Transcriptional regulation of an iron-inducible gene by differential and alternate promoter entries of multiple Myb proteins in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. **Eukaryotic Cell**, 08, p. 362-372, 2009. DOI: 10.1128/EC.00317-08

HUFFMAN, R. D., NAWROCKI, L. D., WILSON, W. A., BRITTINGHAM, A. Digestion of glycogen by a glucosidase released by *Trichomonas vaginalis*. **Experimental Parasitology**, v. 159, p. 151-159, 2015. DOI: 10.1016/j.exppara.2015.09.011

JOHNSTON, V. J., MABEY, D. C. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 21, 56-64, 2008. DOI: 10.1097/QCO.0b013e3282f3d999

JOHNSTONE, R. M., ADAM, M., HAMMOND, J. R., ORR, L., TURBIDE, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). **Journal of Biological Chemistry**, 262, 9412-9420, 1987.

KAYDOS-DANIELS, S. C., MILLER, W. C., HOFFMAN, I., BANDA, T., DZINYEMBA, W., MARTINSON, F., COHEN, M. S., HOBBS, M. M. Validation of a urine-based PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for use in clinical research settings to detect *Trichomonas vaginalis* in men. **Journal of Clinical Microbiology**, 41, 318-323, 2003. DOI: 10.1128/JCM.41.1.318-323.2003

KELLER, S., RIDINGER, J., RUPP, A. K., JANSSEN, J. W., ALTEVOGT, P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. **Journal of Translational Medicine**, 9, 86, 2011. DOI: 10.1186/1479-5876-9-86

KIM, D. K., LEE, J., SIMPSON, R. J., LÖTVALL, J., GHO, Y. S. EVpedia: A community web resource for prokaryotic and eukaryotic extracellular vesicles

research. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 4-7, 2015. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.02.005

KIMURA, S., YAMASHITA, M., YAMAKAMI-KIMURA, M., SATO, Y., YAMAGATA, A., KOBASHIGAWA, Y., INAGAKI, F., AMADA, T., HASE, K., IWANAGA, T., OHNO, H., FUKAI, S. Distinct roles for the N-and C-terminal regions of M-Sec in plasma membrane deformation during tunneling nanotube formation. **Scientific Reports**, 6, 1-12, 2016. DOI: 10.1038/srep33548

KIMURA, S., HASE, K., OHNO, H. The molecular basis of induction and formation of tunneling nanotubes. **Cell and Tissue Research**, 352, 67-76, 2013. DOI: 10.1007/s00441-012-1518-1

KING, J. B., CARTER, A. C., DAI, W., LEE, J. W., KIL, Y. S., DU, L., HELFF, S. K., CAI, S., HUDDLE, B. C., CICHEWICZ, R. H. Design and application of a high-throughput, high-content screening system for natural product inhibitors of the human parasite *Trichomonas vaginalis*. **ACS Infectious Diseases**, 5, 1456-1470, 2019. DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00156

KISSINGER, P. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. **BMC Infectious Diseases**, 15, 307, 2015. DOI: 10.1186/s12879-015-1055-0

KRIEGER, J. N., JENNY, C., VERDON, M., SIEGEL, N., SPRINGWATER, R., CRITCHLOW, C. W., HOLMES, K. K. Clinical manifestations of trichomoniasis in men. **Annals of Internal Medicine**, 118, 844-849, 1993. DOI: 10.7326/0003-4819-118-11-199306010-00003

KUMMER, S., HAYES, G. R., GILBERT, R. O., BEACH, D. H., LUCAS, J. J., SINGH, B. N. Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. **Microbial Pathogenesis**, 44, 197-203, 2008. DOI: 10.1016/j.micpath.2007.09.004

LAM, A., VUONG, D., JEX, A. R., PIGGOTT, A. M., LACEY, E., EMERY-CORBIN, S. J. TriTOX: A novel *Trichomonas vaginalis* assay platform for high-throughput screening of compound libraries. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 15, 68-80, 2021. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2021.01.001

LEE, K. E., KIM, J. H., JUNG, M. K., ARII, T., RYU, J. S., HAN, S. S. Three-dimensional structure of the cytoskeleton in *Trichomonas vaginalis* revealed new features. **Journal of Electron Microscopy**, 58, 305-313, 2009. DOI: 10.1093/jmicro/dfp019

LEHKER, M. W., SWEENEY, D. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. **Sexually Transmitted Infections**, 75, 231-238, 1999. DOI: 10.1136/sti.75.4.231

LEITSCH, D. Recent advances in the *Trichomonas vaginalis* field. **F1000Research**, 5, 2016. DOI: 10.12688/f1000research.7594.1

LOOZE, C., YUI, D., LEUNG, L., INGHAM, M., KALER, M., YAO, X., WU, W. W., SHEN, R. F., DANIELS, M. P., LEVINE, S. J. Proteomic profiling of human plasma

exosomes identifies PPAR $\gamma$  as an exosome-associated protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 378, 433-438, 2009. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.11.050

LLOYD, E. L., GEMMELL, M. A., HENNING, C. B., GEMMELL, D. S., ZABRANSKY, B. J. Transformation of mammalian cells by alpha particles. **International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine**, 36, 467-478, 1979. DOI: 10.1080/09553007914551261

LUSTIG, G., RYAN, C. M., SECOR, W. E., JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis* contact-dependent cytolysis of epithelial cells. **Infection and Immunity**, 81, 1411-1419, 2013. DOI: 10.1128/IAI.01244-12

MABASO, N., ABBAI, N. S. A review on *Trichomonas vaginalis* infections in women from Africa. **Southern African Journal of Infectious Diseases**, 36, 9, 2021. DOI: 10.4102/sajid.v36i1.254

MABASO, N., TINARWO, P., ABBAI, N. Lack of association between *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis* symbiosis in relation to metronidazole resistance. **Parasitology Research**, v. 119, n. 12, p. 4197-4204, 2020. DOI: 10.1007/s00436-020-06930-x

MAKKI, A., RADA, P., ŽÁRSKÝ, V., KEREÏICHE, S., KOVÁČIK, L., NOVOTNÝ, M., JORES, T., RAPAPORT, D., TACHEZY, J. Triplet-pore structure of a highly divergent TOM complex of hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*. **PLoS Biology**, 17, e3000098, 2019. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000098

MALLI, S., BORIES, C., BOURGE, M., LOISEAU, P. M., BOUCHEMAL, K. Surface-dependent endocytosis of poly (isobutylcyanoacrylate) nanoparticles by *Trichomonas vaginalis*. **International Journal of Pharmaceutics**, 548, 276-287, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.07.006

MARGARITA, V., MARONGIU, A., DIAZ, N., DESSÌ, D., FIORI, P. L., RAPPELLI, P. Prevalence of double-stranded RNA virus in *Trichomonas vaginalis* isolated in Italy and association with the symbiont *Mycoplasma hominis*. **Parasitology Research**, 118, 3565-3570, 2019. DOI: 10.1007/s00436-019-06469-6

MARITZ, J. M., LAND, K. M., CARLTON, J. M., HIRT, R. P. What is the importance of zoonotic trichomonads for human health? **Trends in Parasitology**, 30, 2014. DOI: 10.1016/j.pt.2014.05.005

MARTIN-URDIROZ, M., DEEKS, M. J., HORTON, C. G., DAWE, H. R., JOURDAIN, I. The exocyst complex in health and disease. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 4, 24, 2016. DOI: 10.3389/fcell.2016.00024

MATHIVANAN, S., JI, H., SIMPSON, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, 73, 1907-1920, 2010. DOI: 10.1016/j.jprot.2010.06.006

MATINI, M., MAGHSOOD, A. H., MOHEBALI, M., RABIEE, S., FALLAH, M., REZAEI, S., REZAEIAN, M. *In vitro* susceptibility of Iranian isolates of *Trichomonas*

vaginalis to metronidazole. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 11, n. 1, p. 46, 2016. DOI: 10.3389/fmolb.2017.00050

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**, 195, 698-702, 2007. DOI: 10.1086/511278

MEITES, E., GAYDOS, C. A., HOBBS, M. M., KISSINGER, P., NYIRJESY, P., SCHWEBKE, J. R., SECOR, W. E., SOBEL, J. D., WORKOWSKI, K. A. A review of evidence-based care of symptomatic trichomoniasis and asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infections. **Clinical Infectious Diseases**, 61, S837-S848, 2015. DOI: 10.1093/cid/civ738

MENDOZA-LÓPEZ, M. R., BECERRIL-GARCIA, C., FATTEL-FACENDA, L. V., AVILA-GONZALEZ, L., RUÍZ-TACHIQUÍN, M. E., ORTEGA-LOPEZ, J., ARROYO, R. CP30, a Cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. **Infection and Immunity**, 68, 4907-4912, 2000. DOI: 10.1128/IAI.68.9.4907-4912.2000

MENEZES, C. B., FRASSON, A. P., TASCA, T. Trichomoniasis-are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? **Microbial Cell**, 3, 404, 2016. DOI: 10.15698/mic2016.09.526

MERCER, F; JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis*: pathogenesis, symbiont interactions, and host cell immune responses. **Trends in Parasitology**, 34, 683-693, 2018. DOI: 10.1016/j.pt.2018.05.006

MIDDLEJ, V.; BENCHIMOL, M. *Trichomonas vaginalis* kills and eats-evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. **Parasitology**, 137, 65, 2010. DOI: 10.1017/S0031182009991041

MIELCZAREK, E., BLASZKOWSKA, J. *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. **Infection**, v. 44, n. 4, p. 447-458, 2016. DOI: 10.1007/s15010-015-0860-0

MILLER, M. R.; NYIRJESY, P. Refractory trichomoniasis in HIV-positive and HIV-negative subjects. **Current Infectious Disease Reports**, 13, 595, 2011. DOI: 10.1007/s11908-011-0213-9.

MIRHAGHANI, A., WARTON, A. An electron microscope study of the interaction between *Trichomonas vaginalis* and epithelial cells of the human amnion membrane. **Parasitology Research**, 82, 43-47, 1996. DOI: 10.1007/s004360050066

MOLGORA, B. M., RAI, A. K., SWEREDOSKI, M. J., MORADIAN, A., HESS, S., JOHNSON, P. J. A Novel *Trichomonas vaginalis* surface protein modulates parasite attachment via protein: host cell proteoglycan interaction. **Mbio**, 12, 2021. DOI: 10.1128/mBio.03374-20

MONGUIÓ-TORTAJADA, M., MORÓN-FONT, M., GÁMEZ-VALERO, A., CARRERAS-PLANELLA, L., BORRÀS, F. E., FRANQUESA, M. Extracellular-Vesicle

isolation from different biological fluids by size-exclusion chromatography. **Current Protocols in Stem Cell Biology**, 49, 82, 2019. DOI: 10.1002/cpsc.82

MOON, P. G., YOU, S., LEE, J. E., HWANG, D., BAEK, M. C. Urinary exosomes and proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, 30, 1185-1202, 2011. DOI: 10.1002/mas.20319

MÜLLER, M. The hydrogenosome. **Journal Gen. Microbiology**, 139, 2879-2889, 1993. DOI: 10.1099/00221287-139-12-2879

MURATORI, C., CAVALLIN, L. E., KRÄTZEL, K., TINARI, A., DE MILITO, A., FAIS, S., D'ALOJA, P., FEDERICO, M., VULLO, V., FOMINA, A., MESRI, E. A., SUPERTI, F., BAUR, A. S. Massive secretion by T cells is caused by HIV Nef in infected cells and by Nef transfer to bystander cells. **Cell Host & Microbe**, 6, 218-230, 2009. DOI: 10.1016/j.chom.2009.06.009

MUZNY, C. A., SCHWEBKE, J. R. The clinical spectrum of *Trichomonas vaginalis* infection and challenges to management. **Sexually Transmitted Infections**, 89, 423-425, 2013. DOI: 10.1136/sextrans-2012-050893

MUZNY, C. A., BLACKBURN, R. J., SINSKY, R. J., AUSTIN, E. L., SCHWEBKE, J. R. Added benefit of nucleic acid amplification testing for the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* among men and women attending a sexually transmitted diseases clinic. **Clinical Infectious Diseases**, 59, 834-841, 2014. DOI: 10.1093/cid/ciu446

MUZNY, C. A., TAMHANE, A. R., EATON, E. F., HUDAK, K., BURKHOLDER, G. A., SCHWEBKE, J. R. Incidence and predictors of reinfection with trichomoniasis based on nucleic acid amplification testing results in HIV-infected patients. **International Journal of STD & AIDS**, 30, 344-352, 2019. DOI: 10.1177/0956462418807115

MUZNY, C. A., VAN GERWEN, O. T., KISSINGER, P. Updates in *Trichomonas* treatment including persistent infection and 5-nitroimidazole hypersensitivity. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 33, n. 1, p. 73, 2020. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000618

NANDA, N., MICHEL, R. G., KURDGELASHVILI, G., WENDEL, K. A. Trichomoniasis and its treatment. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, 4, 125-135, 2006. DOI: 10.1586/14787210.4.1.125

NATHAN, B., APPIAH, J., SAUNDERS, P., HERON, D., NICHOLS, T., BRUM, R., ALEXANDER, S., BARAITSER, P., ISON, C. Microscopy outperformed in a comparison of five methods for detecting *Trichomonas vaginalis* in symptomatic women. **International Journal of STD & AIDS**, v. 26, n. 4, p. 251-256, 2015. DOI: 10.1177/0956462414534833

NAWAZ, M., FATIMA, F., NAZARENKO, I., EKSTRÖM, K., MURTAZA, I., ANEES, M., SULTAN, A., NEDER, L., CAMUSSI, G., VALADI, H., SQUIRE, J. A., KISLINGER, T. Extracellular vesicles in ovarian cancer: applications to tumor

biology, immunotherapy and biomarker discovery. **Expert Review of Proteomics**, 13, 395-409, 2016. DOI: 10.1586/14789450.2016.1165613

NAWAZ, M., FATIMA, F. Extracellular vesicles, tunneling nanotubes, and cellular interplay: synergies and missing links. **Frontiers in Molecular Biosciences**, 4, 50, 2017. DOI: 10.3389/fmolb.2017.00050

NEWMAN, L., ROWLEY, J., VANDER HOORN, S., WIJESOORIYA, N. S., UNEMO, M., LOW, N., STEVENS, G., GOTTLIEB, S., KIARIE, J., TEMMERMAN, M. Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. **PloS One**, 10, e0143304, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0143304

O'BRIEN, K., BREYNE, K., UGHETTO, S., LAURENT, L. C., BREAKEFIELD, X. O. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 21, 585-606, 2020. DOI: 10.1038/s41580-020-0251-y

OLMOS-ORTIZ, L. M., BARAJAS-MENDIOLA, M. A., BARRIOS-RODILES, M., CASTELLANO, L. E., ARIAS-NEGRETE, S., AVILA, E. E., CUÉLLAR-MATA, P. *Trichomonas vaginalis* exosome-like vesicles modify the cytokine profile and reduce inflammation in parasite-infected mice. **Parasite Immunology**, 39, e12426, 2017. DOI: 10.1111/pim.12426

ONFELT, B., PURBHOO, M. A., NEDVETZKI, S., SOWINSKI, S., DAVIS, D. M. Long-distance calls between cells connected by tunneling nanotubules. **Science's STKE**, pe55-pe55, 2005. DOI: 10.1126/stke.3132005pe55

ONG, S. J., HSU, H. M., LIU, H. W., CHU, C. H., TAI, J. H. Activation of multifarious transcription of an adhesion protein ap65-1 gene by a novel Myb2 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Biological Chemistry**, 282, 6716-6725, 2007. DOI: 10.1074/jbc.M610484200

OSTEIKOETXEA-MOLNÁR, A., SZABÓ-MELEG, E., TÓTH, E. A., OSZVALD, Á., IZSÉPI, E., KREMLITZKA, M., BIRI, B., NYITRAY, L., BOZÓ, T., NÉMETH, P., KELLERMAYER, M., NYITRAI, M., MATKO, J. The growth determinants and transport properties of tunneling nanotube networks between B lymphocytes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 73, 4531-4545, 2016. DOI: 10.1007/s00018-016-2233-y

PAN, B. T., TENG, K., WU, C., ADAM, M., JOHNSTONE, R. M. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. **The Journal of Cell Biology**, 101, 942-948, 1985. DOI: 10.1083/jcb.101.3.942

PANT, S., HILTON, H., BURCZYNSKI, M. E. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. **Biochemical Pharmacology**, 83, 1484-1494, 2012. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.12.037

PEARLMAN, M. D., YASHAR, C., ERNST, S., SOLOMON, W. An incremental dosing protocol for women with severe vaginal trichomoniasis and adverse reactions to

metronidazole. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 174, 934-936, 1996. DOI: 10.1016/s0002-9378(96)70329-0

PEREIRA-NEVES, A., BENCHIMOL, M. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. **Biology of the Cell**, 99, 87-101, 2007. DOI: 10.1042/BC20060084

PEREIRA-NEVES, A., RIBEIRO, K. C., BENCHIMOL, M. Pseudocysts in trichomonads—new insights. **Protist**, 154, 313-329, 2003.

PEREIRA-NEVES, A., BENCHIMOL, M. *Trichomonas vaginalis*: in vitro survival in swimming pool water samples. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 3, p. 438-441, 2008. DOI: 10.1016/j.exppara.2007.09.005

PETRIN, D., DELGATY, K., BHATT, R., GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, 11, 300-317, 1998. DOI: 10.1128/CMR.11.2.300

POOLE, D. N., MCCLELLAND, R. S. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. **Sexually Transmitted Infections**, 89, 418-422, 2013. DOI: 10.1136/sextrans-2013-051075

PRINCIPE, S., JONES, E. E., KIM, Y., SINHA, A., NYALWIDHE, J. O., BROOKS, J., SEMMES, O. J., TROYER, D. A., LANCE, R. S., KISLINGER, T., DRAKE, R. R. In-depth proteomic analyses of exosomes isolated from expressed prostatic secretions in urine. **Proteomics**, 13, 1667-1671, 2013. DOI: 10.1002/pmic.201200561

QUEIROZ, R. C., SANTOS, L. M., BENCHIMOL, M., DE SOUZA, W. Cytochemical localization of enzyme markers in *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, 77, 561-566, 1991. DOI: 10.1007/BF00931013

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, 200, 373-383, 2013. DOI: 10.1083/jcb.201211138

RASMUSSEN, S. E.; NIELSEN, M. H.; LIND, I.; RHODES, J. M. Morphological studies of the cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis* to normal human vaginal epithelial cells in vitro. **Genitourinary Medicine**, 62, 240-246, 1986. DOI: 10.1136/sti.62.4.240

REGAN, D. G.; HUI, B. B.; GUY, R. J.; DONOVAN, B.; HOCKING, J. S.; LAW, M. G. Supplemental *Trichomonas vaginalis* testing is required to maintain control following a transition from Pap smear to HPV DNA testing for cervical screening: a mathematical modelling study. **Sexually Transmitted Infections**, 96, 76-78, 2020. DOI: 10.1136/sextrans-2018-053845.

RENDÓN-GANDARILLA, F. J.; RAMÓN-LUING, L. L. A.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; ANDRADE, I. R.; BENCHIMOL, M.; ARROYO, R. The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/561979.

RIBEIRO, K. C.; MONTEIRO-LEAL, L. H.; BENCHIMOL, M. Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and

*Trichomonas vaginalis*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 47, 481-492, 2000. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2000.tb00077.x.

RIBEIRO, L. C.; SANTOS, C.; BENCHIMOL, M. Is *Trichomonas tenax* a parasite or a commensal? **Protist**, 166, 196-210, 2015. DOI: 10.1016/j.protis.2015.02.002.

ROBINSON, S. C. Trichomonal vaginitis resistant to metranidazole. **Canadian Medical Association Journal**, 86, 665, 1962. PMID: 20327097

ROGERS, R. S.; NISHIMUNE, H. The role of laminins in the organization and function of neuromuscular junctions. **Matrix Biology**, 57, 86-105, 2017. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.08.008.

ROWLEY, J.; HOORN, S. V.; KORENROMP, E.; LOW, N.; UNEMO, M.; ABU-RADDAD, L. J.; CHICO, R. M.; SMOLAK, A.; NEWMAN, L.; GOTTLIEB, S.; THWIN, S. S.; BROUTET, N.; TAYLOR, M. M. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. **Bulletin of the World Health Organization**, 97, 548, 2019. DOI: 10.2471/BLT.18.228486.

RUSTOM, A. SAFFRICH, R.; MARKOVIC, I.; WALTHER, P.; GERDES, H. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. **Science**, 303, 1007-1010, 2004. DOI: 10.1126/science.1093133.

SCHILLER, C.; HUBER, J. E.; DIAKOPOULOS, K. N.; WEISS, E. H. Tunneling nanotubes enable intercellular transfer of MHC class I molecules. **Human Immunology**, 74, 412-416, 2013. DOI: 10.1016/j.humimm.2012.11.026.

SCHOREY, J. S.; BHATNAGAR, S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. **Traffic**, 9, 871-881, 2008. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x.

SCHWEBKE, J. R.; BARRIENTES, F. J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 50, 4209-4210, 2006. DOI: 10.1128/AAC.00814-06.

SCHWEBKE, J. R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, 17, 794-803, 2004. DOI: 10.1128/CMR.17.4.794-803.2004.

SCHWEBKE, J.R.; LAWING, L. F. Improved Detection by DNA Amplification of *Trichomonas vaginalis* in Males. **Journal of Clinical Microbiology**, 40, 3681– 3683, 2002. DOI: 10.1128/JCM.40.10.3681-3683.2002.

SCHWEBKE, J. R.; GAYDOS, C. A.; DAVIS, T.; MARRAZZO, J.; FURGERSON, D.; TAYLOR, S. N.; SMITH, B.; BACHMANN, L. H.; ACKERMAN, R.; SPURRELL, T.; FERRIS, D.; BURNHAM, C. A.; RENO, H.; LEBED, J.; EISENBERG, D.; KERNDT, P.; PHILIP, S.; JORDAN, J.; QUIGLEY, N. Clinical evaluation of the Cepheid Xpert TV assay for detection of *Trichomonas vaginalis* with prospectively collected specimens from men and women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 2, p. e01091-17, 2018. DOI: 10.1128/JCM.01091-17.

SCHWEBKE, J. R.; BURGESS, D. *Trichomoniasis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 794-803, 2004. DOI: 10.1128/CMR.17.4.794-803.2004.

SECOR, W. E. *Trichomonas vaginalis*: treatment questions and challenges. **Expert Review of anti-Infective Therapy**, 10, 107-109, 2012. DOI: 10.1586/eri.11.159.

SENA, A. C.; MILLER, W. C.; HOBBS, M. M.; SCHWEBKE, J. R.; LEONE, P. A.; SWYGARD, H.; ATASHILI, J.; COHEN, M. S. *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. **Clinical Infectious Diseases**, 13-22, 2007. DOI: 10.1086/511144.

SHEELE, J. M.; CRANDALL, C. J. ARKO, B. L.; VALLABHANENI, M.; DUNN, C. T.; CHANG, B. F.; FANN, P.; BIGACH, M. The OSOM® *Trichomonas* Test is unable to accurately diagnose *Trichomonas vaginalis* from urine in men. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 37, n. 5, p. 1002-1003, 2019. DOI: 10.1016/j.ajem.2018.10.022.

SILVERMAN, J. M.; REINER, N. E. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. **Cellular Microbiology**, 13, 1-9, 2011. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01537.x.

SIMPSON, C.F.; WHITE, F.H. Structure of *Trichomonas foetus* as revealed by electron microscopy. **American Journal of Veterinary Research**, 25, 815-824, 1964. PMID: 14141525.

SIMPSON, R. J.; JENSEN, S. S.; LIM, J. W. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. **Proteomics and Systems Biology**, 8, 4083-4099, 2008. DOI: 10.1002/pmic.200800109.

SMITH, R. W.; BRITTINGHAM, A.; WILSON, W. A. Purification and identification of amylases released by the human pathogen *Trichomonas vaginalis* that are active towards glycogen. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 210, n. 1-2, p. 22-31, 2016. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2016.08.002.

SOOD, S.; KAPIL, A. An update on *Trichomonas vaginalis*. **Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS**, v. 29, n. 1, p. 7, 2008. DOI:10.4103/0253-7184.42707.

SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. **Emerging Infectious Diseases**, 7, 927-932, 2001. DOI: 10.3201/eid0706.010603.

ŠTÁFKOVÁ, J.; RADA, P.; MELONI, D.; ŽÁRSKÝ, V.; SMUTNÁ, T.; ZIMMANN, N.; HARANT, K.; POMPACH, P.; HRDÝ, I.; TACHEZY, J. Dynamic secretome of *Trichomonas vaginalis*: Case study of  $\beta$ -amylases. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 17, n. 2, p. 304-320, 2018. DOI: 10.1074/mcp.RA117.000434.

SUTAK, R.; Dolezal, P.; FIUMERA, H. L.; HRDY, I.; DANCIS, A.; DELGADILLO-CORREA, M.; JOHNSON, P. J.; MÜLLER, M.; TACHEZY, J. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101, 10368-10373, 2004. DOI: 10.1073/pnas.0401319101.

SZEMPRUCH, A. J.; SYKES, S. E.; KIEFT, R.; DENNISON, L.; BECKER, A. C.; GARTRELL, A.; MARTIN, W. J.; NAKAYASU, E. S.; ALMEIDA, I. C.; HAJDUK, S. L.;

HARRINGTON, J. M. Extracellular vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia. **Cell**, 164, 246-257, 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.051.

TAYLOR, D. D.; GERCEL-TAYLOR, C. Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. In: **Seminars in Immunopathology**. 441-454, 2011. DOI: 10.1007/s00281-010-0234-8.

TAYLOR, J.; JAISWAL, R.; BEBAWY, M. Calcium-calpain dependent pathways regulate vesiculation in malignant breast cells. **Current Cancer Drug Targets**, 17, 486-494, 2017. DOI: 10.2174/1568009616666161026165736.

TER KUILE, B. H.; MÜLLER, M. Maltose utilization by extracellular hydrolysis followed by glucose transport in *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology**, v. 110, n. 1, p. 37-44, 1995. DOI: 10.1017/s0031182000081026.

THÉRY, C.; REGNAULT, A.; GARIN, J.; WOLFERS, J.; ZITVOGEL, L.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RAPOSO, G.; AMIGORENA, S. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes: selective accumulation of the heat shock protein hsc73. **The Journal of Cell Biology**, 147, 599-610, 1999. DOI: 10.1083/jcb.147.3.599.

THÉRY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nature Reviews Immunology**, 9, 581, 2009. DOI: 10.1038/nri2567.

THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nature reviews Immunology**, 2, 569-579, 2002. DOI: 10.1038/nri855.

TKACH, M.; THÉRY, C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. **Cell**, 164, 1226-1232, 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.043.

TSUJI, K.; KITAMURA, S. Trophic factors from tissue stem cells for renal regeneration. **Stem Cells International**, 2015, 2015. DOI: 10.1155/2015/537204.

TWU, O.; MIGUEL, N.; LUSTIG, G.; STEVENS, G. C.; VASHISHT, A. A.; WOHLSCHEGEL, J. A.; JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host: parasite interactions. **PLoS Pathogens**, 9, e1003482, 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003482.

VALADI, H.; EKSTRÖM, K.; BOSSIOS, A.; SJÖSTRAND, M.; LEE, J. J.; LÖTVALL, J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, 9, 654, 2007. DOI: 10.1038/ncb1596.

VAN DER POL, B. *Trichomonas vaginalis* infection: the most prevalent nonviral sexually transmitted infection receives the least public health attention. **Clinical Infectious Diseases**, 44, 23-25, 2007. DOI: 10.1086/509934.

VAN DER POL, E.; HOEKSTRA, A. G.; STURK, A.; OTTO, C.; VAN LEEUWEN, T. G.; NIEUWLAND, R. Optical and non-optical methods for detection and

characterization of microparticles and exosomes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 8, 2596-2607, 2010. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04074.x.

VIEIRA-BAPTISTA, P.; SILVA, A. R.; COSTA, M.; AGUIAR, T.; SALDANHA, C.; SOUSA, C. Clinical validation of a new molecular test (Seegene® Allplex™ Vaginitis) for the diagnosis of vaginitis: a cross sectional study. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, 2021. DOI: 10.1111/1471-0528.16661.

VISCOGLIOSI, E.; PHILIPPE, H.; BAROIN, A.; PERASSO, R.; BRUGEROLLE, G. Phylogeny of trichomonads based on partial sequences of large subunit rRNA and on cladistic analysis of morphological data. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 40, 411-421, 1993. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1993.tb04935.x.

WANG, X.; GERDES, H-H. Long-distance electrical coupling via tunneling nanotubes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, 1818, 2082-2086, 2012. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.09.002.

WARTOŃ, A.; HONIGBERG, B. M. Structure of trichomonads as revealed by scanning electron microscopy. **The Journal of Protozoology**, 26, 1979. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1979.tb02732.x.

WIJESOORIYA, N. S.; ROCHAT, R. W.; KAMB, M. L.; TURLAPATI, P.; TEMMERMAN, M.; BROUTET, N.; NEWMAN, L. M. Global burden of maternal and congenital syphilis in 2008 and 2012: a health system modelling study. **The Lancet Global Health**, v. 4, n. 8, p. e525-e533, 2016. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30135-8](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30135-8).

WILSON, W. A.; PRADHAN, P.; MADHAN, N.; GIST, G. C.; BRITTINGHAM, A. Glycogen synthase from the parabasalian parasite *Trichomonas vaginalis*: An unusual member of the starch/glycogen synthase family. **Biochimie**, v. 138, p. 90-101, 2017. DOI: 10.1016/j.biochi.2017.04.016.

WØLNER-HANSEN, P.; KRIEGER, J. N.; STEVENS, C. N.; KIVIAT, N. B.; KOUTSKY, L.; CRITCHLOW, C.; DEROUEN, T.; HILLIER, S.; HOLMES, K. K. Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. **JAMA**, 261, 571-576, 1989. DOI: 10.1001/jama.1989.03420040109029.

WORKOWSKI, K. A. Centers for Disease Control and Prevention sexually transmitted diseases treatment guidelines. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. suppl\_8, p. S759-S762, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report on global sexually transmitted infection surveillance 2018**, 2018.

XU, R.; RAI, A.; CHEN, M.; SUWAKULSIRI, W.; GREENING, D. W.; SIMPSON, R. J. Extracellular vesicles in cancer—implications for future improvements in cancer care. **Nature Reviews Clinical Oncology**, 15, 617-638, 2018. DOI: 10.1038/s41571-018-0036-9.

YAMASHITA, Y. M.; INABA, M.; BUSZCZAK, M. Specialized intercellular communications via cytonemes and nanotubes. **Annual Review of Cell and**

**Developmental Biology**, v. 34, p. 59-84, 2018. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062932.

YANG, C.; ROBBINS, P. D. The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. **Clinical and Developmental Immunology**, 2011, 2011. DOI: 10.1155/2011/842849.

YAO, Y. Laminin: loss-of-function studies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 74, 1095-1115, 2017. DOI: 10.1007/s00018-016-2381-0

ZHANG, Z.; SONG, X.; ZHANG, Z.; LI, H.; DUAN, Y.; ZHANG, H.; LU, H.; LUO, C.; WANG, M. The molecular characterization and immune protection of adhesion protein 65 (AP65) of *Trichomonas vaginalis*. **Microbial Pathogenesis**, 152, 104750, 2021. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.104750.

ZHANG, Z.; LI, Y.; WANG, S.; HAO, L.; ZHU, Y.; LI, H.; SONG, X.; DUAN, Y.; SANG, Y.; WU, P.; LI, X. The Molecular Characterization and Immunity Identification of *Trichomonas vaginalis* Adhesion Protein 33 (AP33). **Frontiers in Microbiology**, 11, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01433.

ZOMER, A.; VENDRIG, T.; HOPMANS, E. S.; VAN EIJDHOVEN, M.; MIDDELDORP, J. M.; PEGTEL, D. M. Exosomes: fit to deliver small RNA. **Communicative & Integrative Biology**, 3, 447-450, 2010. DOI: 10.4161/cib.3.5.12339.