

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



1

2

3

4

TESE DE DOUTORADO

5

6

7

8

**Efeitos dos derivados de amiodarona, análogos de fosfolipídios e SQ109
em *Trichomonas vaginalis***

9

10

11

Doutoranda: **Tatiana Guinancio de Souza**

12

13

14

15

16

17

18

19

Duque de Caxias

20

2024

21

22

23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

Tatiana Guinancio de Souza

**Efeitos dos derivados de amiodarona, análogos de fosfolipídios e SQ109
em *Trichomonas vaginalis***

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional –
(UNIGRANRIO, INMETRO e UERJ-ZO)
como requisito básico para o título de
Doutor em Ciências Biomédicas.

Orientadores:

Prof^a Marlene Benchimol
Prof. Wanderley de Souza

Duque de Caxias
2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

S729
e

Souza, Tatiana Guinancio de.

Efeitos dos derivados de amiodarona, análogos de fosfolipídios e SQ109 em *Trichomonas vaginalis* / Tatiana Guinancio de Souza. – Duque de Caxias, Rio de Janeiro, 2024.
157 f.: il.

Orientadora: Marlene Benchimol.
Orientador: Wanderley de Souza.

Tese (doutorado) – UNIGRANRIO, Escola de Ciência da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Rio de Janeiro, 2024.

1. Metronidazol. 2. Microscopia eletrônica. 3. Novas drogas. 4. Tricomoníase.
5. Ultraestrutura. I. Benchimol, Marlene. II. Souza, Wanderley de. III. Título.
IV. UNIGRANRIO.

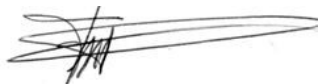
CDD:
610

ATA DE DEFESA DE TESE

Às 13h30min, do dia 01 de abril de 2024, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, realizou sessão de Defesa da Tese versando sobre o projeto intitulado “**Efeitos dos derivados de amiodarona, análogos de fosfolipídios e SQ109 em *Trichomonas vaginalis***”, de autoria de Tatiana Guinancio de Souza, aluna do Doutorado Acadêmico, sob orientação da Professora Marlene Benchimol e do Professor Wanderley de Souza. A sessão foi aberta pelo Prof. Fabio Fortes, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof. Sérgio Henrique Seabra, Prof. Rafael Mariante e Prof. Antônio Pereira Neves. Em seguida, passou à palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores e suas respostas foram consideradas **SATISFATÓRIAS**.

O presidente declarou a doutoranda Tatiana Guinancio de Souza **APROVADA**, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Biomédicas, de acordo como o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UERJ. 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, 01 de Abril de 2024.



Prof. Dr. Fabio da Silva de Azevedo Fortes Universidade
do Estado do Rio de Janeiro – UERJ/ZO Presidente da
banca



Prof. Sérgio Henrique Seabra
Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF

Documento assinado digitalmente
 **ANTONIO PEREIRA DAS NEVES NETO**
Data: 01/04/2024 17:30:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Antônio Pereira Neves
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ-PE

Documento assinado digitalmente
 **RAFAEL MARIANTE MEYER**
Data: 01/04/2024 23:39:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Rafael Mariante
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ-IOC

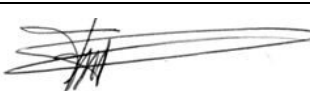


Prof. Sergian Vianna Cardozo Coordenador
Geral



Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional - BIOTRANS



(i) Aprovado com Ressalvas e Modificações	
Comentários:	
Não se aplica.	
	Presidente:

47

48

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos científicos

Aos meus queridos orientadores, Prof^a. Marlene Benchimol e Prof. Wanderley de Souza, primeiramente gostaria de dizer que me sinto honrada por ter sido orientada por vocês! Dois pesquisadores com tamanho prestígio, que fazem parte da lista de cientistas mais influentes do planeta, me faltam palavras para exprimir tamanha gratidão. Obrigada pela oportunidade de aprendizado, pela orientação, por toda dedicação, paciência, confiança no meu trabalho, por me ensinar, pela compreensão e pelos sábios conselhos sempre que procurei vocês para conversar e, principalmente, pela amizade durante todo processo. Gostaria de agradecê-los por terem sido compreensíveis em muitos momentos, principalmente nos momentos em que eu vi meu mundo desabar, onde eu me via sem forças para continuar e muitas das vezes cogitei em desistir e vocês sempre com sábios conselhos, me fazendo ver a vida por uma outra perspectiva. Muito obrigada!

Agradeço a todos os integrantes ou ex-integrantes do laboratório LUCHM, em especial, gostaria de destacar: Júlio Santana, Roberta Veríssimo, Victor Midlej, Noêmia Rodrigues, Paula Bandeira, Everson Telles, Raphael Verdan, Sharmila Ortiz, Prof. Ana Gadelha, Otávio Pacheco, Verônica Santos, Carlla Araújo, Thayane Borges e Tatiana Araújo. Vocês foram cruciais para realização deste trabalho.

Agradeço aos professores e amigos que fiz no programa de pós-graduação BIOTRANS. Obrigada por todos os ensinamentos e momentos compartilhados. Especialmente ao Prof. Sergian Vianna Cardozo, coordenador geral do programa, por ter sido sempre muito solícito.

Aos co-autores dos artigos científicos, Dr. Gustavo Benaim e Dr. Renato Granado, muito obrigada por toda contribuição.

Agradeço à UFRJ, CENABIO, UEZO, INMETRO, FAPERJ, CNPq e CAPES que contribuíram para a realização deste trabalho. A FAPERJ, pela bolsa de

doutorado cedida e financiamento com os termos de Outorga concedidos à
Marlene Benchimol PROCESSOS E-26/ 202.824/2017 e E-26/200.956/2021.

Agradecimentos pessoais

Aos meus pais, Eliana Guinancio e Tércio de Souza, por terem sido minha rede de apoio. Não foram apenas pais, mas amigos e companheiros mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis. Incontáveis foram as vezes que meu cansaço e preocupação foram compartilhados e vocês procuravam sempre amenizar minha ansiedade mantendo-me firme diante dos obstáculos, me incentivando a prosseguir.

Ao meu filho, Tarcísio Guinancio, tão pequenininho, mas que me deu muita força e coragem para ir atrás dos meus objetivos e foi minha maior motivação para eu não desistir em meio a tantos momentos difíceis. Essa conquista é nossa, filho! Eu te amo mais que tudo nessa vida!

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135 "Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta."

136 (Carl Sagan)

137

139 *Trichomonas vaginalis* é um protozoário parasita extracelular do trato
140 urogenital, agente etiológico da tricomoníase humana, infecção sexualmente
141 transmissível que acomete cerca de 156 milhões de pessoas no mundo. Esta
142 patologia é mais evidente no sexo feminino, podendo provocar abortos, partos
143 prematuros e infertilidade. A doença também pode levar a uma maior
144 predisposição à infecção pelo vírus HIV, ao câncer cervical e de próstata. O
145 metronidazol (MTZ) tem sido a droga de escolha no tratamento da tricomoníase
146 humana. No entanto, este medicamento está relacionado a muitos efeitos
147 colaterais, não podendo ser utilizado durante a gravidez e tornando-se
148 inaceitável para vários pacientes. Assim, a busca por um novo fármaco para o
149 tratamento da tricomoníase torna-se absolutamente necessário. No presente
150 estudo, utilizamos novos compostos derivados de amiodarona, análogos de
151 fosfolipídios e o composto SQ109 que foram analisados por diferentes técnicas,
152 com os objetivos de selecionar compostos promissores e o mecanismo de ação
153 no parasita. Utilizamos microscopia eletrônica de varredura (MEV) e
154 transmissão (MET), entre outras, para visualizar as alterações ultraestruturais
155 induzidas pelos compostos. Observamos que a amiodarona estimulou, ao invés
156 de inibir, o crescimento do parasita, induziu a agregação celular e acúmulo de
157 glicogênio no citosol. Os compostos amioder e dronedarona apresentaram
158 atividade antiparasitária com IC₅₀ de 3,15 e 11 µM, respectivamente, e levaram
159 as células a um processo de morte semelhante a apoptose. Além disso, as
160 células exibiram diversas alterações morfológicas. O composto SQ109 inibiu o
161 crescimento de *T. vaginalis* com um IC₅₀ de 3,15 µM. A análise microscópica
162 mostrou alterações morfológicas, as células tornaram-se arredondadas com
163 projeções superficiais. Os hidrogenossomos apresentaram aumento
164 significativo de tamanho. Uma pesquisa de bioinformática foi feita sobre o
165 composto SQ109 para encontrar seus possíveis alvos e mecanismos de ação.
166 Os análogos de fosfolipídios inibiram o crescimento de *T. vaginalis* com um IC₅₀
167 de 4,48 e 5,67 µM, respectivamente. As observações por MEV revelaram a
168 presença de protrusões na superfície após o tratamento. As análises por MET
169 mostraram a presença de vacúolos com figuras mielínicas e vacuolização no
170 citoplasma após incubação com os compostos. Além disso, após os
171 tratamentos com os compostos LDT117 e LDT134, os parasitas apresentaram

172 marcação positiva para TUNEL, indicando indução de morte por um
173 mecanismo semelhante a apoptose. Nossas observações indicam que alguns
174 compostos testados se apresentaram promissores contra *T. vaginalis in vitro*,
175 sugerindo sua utilidade potencial como quimioterapia alternativa para
176 tricomoníase.

177

178 **Palavras-Chave:** Tricomoníase; metronidazol; microscopia eletrônica; novas
179 drogas; ultraestrutura.

180

181

182

183

184

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is an extracellular protozoan parasite of the urogenital tract, the etiological agent of human trichomoniasis, a sexually transmitted infection that affects approximately 156 million people worldwide. This pathology is more evident in females and can cause miscarriages, premature births, and infertility. The disease can also lead to a greater predisposition to HIV infection and cervical and prostate cancer. Metronidazole (MTZ) has been the drug of choice in the treatment of human trichomoniasis. However, this medication is related to many side effects, cannot be used during pregnancy, and becomes unacceptable for many patients. Therefore, the search for a new drug for the treatment of trichomoniasis becomes necessary. In the present study, we used new compounds derived from amiodarone, phospholipids, and the compound SQ109 that were analyzed using different techniques, with the objectives of selecting promising compounds and the mechanism of action on the parasite. We use scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (MET), among others, to visualize the ultrastructural changes induced by the compounds. We observed that amiodarone stimulated, rather than inhibited, the growth of the parasite, induced cell aggregation and accumulation of glycogen in the cytosol. The compounds amioder and dronedarone showed antiparasitic activity with IC_{50} of 3.15 and 11 μM , respectively, and led the cells to a death process like apoptosis. Furthermore, the cells exhibited several morphological changes. Compound SQ109 inhibited the growth of *T. vaginalis* with an IC_{50} of 3.15 μM . Microscopic analysis showed morphological changes, the cells became rounded with superficial projections. The hydrogenosomes showed a significant increase in size. Bioinformatics research was done on the compound SQ109 to find its possible targets and mechanisms of action. Phospholipid analogues inhibited the growth of *T. vaginalis* with an IC_{50} of 4.48 and 5.67 μM , respectively. SEM observations revealed the presence of protrusions on the surface after treatment. TEM analyses showed vacuoles with myelin figures and vacuolation in the cytoplasm after incubation with the compounds. Furthermore, after treatments with the compounds LDT117 and LDT134, the parasites showed positive staining for TUNEL, indicating induction of death by a mechanism like apoptosis. Our observations indicate that some compounds tested showed promise against *T.*

219 *vaginalis in vitro*, suggesting their potential usefulness as alternative
220 chemotherapy for trichomoniasis.

221

222 **Keywords:** Trichomoniasis; metronidazole; electron microscopy; new drugs;
223 ultrastructure.

224

225

226

227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257

LISTA DE ABREVIATURAS

- APL** - Análogo de fosfolipídeo / alquilfosfolipídios
- ATCC** - *American Type Culture Collection*
- ATP** - Adenosina trifosfato
- CDC** – Centro de Controle de Prevenção em Doenças
- DAPI** - 4', 6-*diamidino-2-fenilindol*
- DIC** - Contraste Interferencial diferencial
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- DNA** - Ácido Desoxirribonucleico
- FA** – Flagelos anteriores
- FDA** - Diacetato de fluoresceína (*fluorescein diacetate*)
- FDA** - Food & Drug Administration
- FR** – Flagelo recorrente
- IST** – Infecções Sexualmente Transmissíveis
- JC-1**- 5,5',6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazol-carbocianineiódico
- MET** - Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV** - Microscopia Eletrônica de Varredura
- MTZ** - Metronidazol
- MLT** – Mitelfosina
- MVB** - Corpos multivesiculares
- OMS** - Organização Mundial de Saúde
- PBS** - *Phosphate buffered saline*
- PMS** - Metosulfato de fenazina
- RE** – Retículo endoplasmático
- RPMI** - Roswell Park Memorial Institute
- SFB** - Soro Fetal Bovino
- TYM** - *Tryptcase* - *Yeast extract* - Maltose
- VEs** - Vesículas extracelulares

260	1. Introdução.....	15
261	1.1 <i>Trichomonas vaginalis</i>	15
262	1.2 Epidemiologia	16
263	1.3. Manifestações clínicas.....	17
264	1.4. Diagnóstico	18
265	1.5. Morfologia	19
266	1.6. Ultraestrutura	20
267	1.6.1. Superfície Celular.....	20
268	1.6.2. Organelas.....	21
269	1.6.2.1. Retículo Endoplasmático.....	22
270	1.6.2.2. Complexo de Golgi e filamentos parabasais	22
271	1.6.2.3. Vacúolos e Lisossomos.....	23
272	1.6.2.4. Hidrogenossomos	24
273	1.6.2.5. Núcleo e divisão.....	27
274	1.6.3. Citoesqueleto	28
275	1.6.3.1. Complexo Pelta-Axóstilo	28
276	1.6.3.2. Corpúsculos basais e flagelos.....	29
277	1.6.3.4 Costa.....	29
278	1.7. Interação-parasito hospedeiro e patogenicidade	30
279	1.7.1 Microvesículas e exossomos de <i>T. vaginalis</i>	34
280	1.7.2. Nanotubos de tunelamento	36
281	1.8. Tratamento	37
282	1.8.1. Resistência ao MTZ	40
283	1.9. Novos compostos alternativos ao metronidazol	42
284	1.9.1. Amiodarona, dronedarona e amioder	42

285	1.9.2. SQ109.....	43
286	1.9.3. Análogos de alquilfosfolipídios (APL)	44
287	2. Justificativa	46
288	3. Objetivos.....	47
289	3.1. Objetivo Geral	47
290	3.2. Objetivos específicos	47
291	4. Metodologia	48
292	4.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>T. vaginalis</i>	48
293	4.2 Compostos	48
294	4.2.1 Amiodarona, dronedarona e amioder.....	49
295	4.2.2 SQ109.....	49
296	4.2.3 Análogos de alquilfosfolipídios (APL)	49
297	4.2.4 Tabela 4. Compostos utilizados e sua origem.....	50
298	4.3. Curva de crescimento	51
299	4.3.1 Cálculo de IC ₅₀	52
300	4.4. Ensaio de viabilidade	52
301	4.4.1 Ensaio de viabilidade com diacetato de fluoresceína e 7-AAD.....	52
302	4.4.2. Ensaio de viabilidade com MTS/PSM	53
303	4.5. Análise da toxicidade em células de mamíferos.....	53
304	4.6. Microscopia de fluorescência	54
305	4.6.1 Imunofluorescência	54
306	4.6.2. TUNEL	55
307	4.6.3. Potencial de membrana hidrogenossomal	56
308	4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	56
309	4.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	57
310	4.9. Morfometria.....	58
311	4.10. Citoquímica - Método de Thiéry (Thiéry 1967).....	58

312	4.11. Citometria de Fluxo.....	58
313	4.11.1 Ensaio para avaliação do ciclo celular	58
314	4.12. Análise estatística	59
315	4.13. Previsão de interações moleculares	59
316	4.14. Simulação de ancoramento molecular.....	59
317	5. Resultados.....	60
318	5.1. Seleção dos compostos	60
319	5.2. Efeito da amiodarona, amioder e dronedarona em <i>T. vaginalis</i>	61
320	5.2.1. Curvas de crescimento.....	61
321	5.3. Observações microscópicas	64
322	5.4. Microscopia óptica	64
323	5.4.1 Contraste de fase	64
324	5.4.2. Imunofluorescência	65
325	5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	70
326	5.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	72
327	5.7. Resultados com a droga SQ109.....	75
328	5.7.1 Curva de crescimento	75
329	5.8. Imunofluorescência	76
330	5.8.1. Viabilidade celular usando 7-AAD e FDA.....	77
331	5.8.2 Viabilidade do hidrogenossomo usando JC-1	78
332	5.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	80
333	5.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	80
334	5.10.1. Morfometria	81
335	5.10.2. Técnica de <i>Thiery</i>	82
336	5.11. Ancoragem molecular	83
337	5.12. Análogos de fosfolipídios (APL)	86
338	5.12.1 Curvas de crescimento.....	86

339	5.12.2 Ensaio de citotoxicidade.....	89
340	5.13. Imunofluorescência.....	89
341	5.14. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	91
342	5.15. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	93
343	6. Discussão	96
344	6.1. Amiodarona, amioder e dronedarona.....	96
345	6.2. SQ109.....	99
346	6.3. APL LDT 117 e LDT134.....	103
347	7. Conclusões.....	106
348	8. Referências Bibliográficas.....	108
349	Anexo 1	135
350	Anexo 2	135
351		
352		
353		
354		

1. Introdução

1.1 *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis é parasito extracelular (Fig. 1) pertencente ao Filo Parabasalia. A família Trichomonadidae pode ser encontrada em diferentes hospedeiros sendo capaz de infectar mamíferos, aves e répteis. Esse parasita vive em ambientes anaeróbicos ou microaerófilos (CAVALIER-SMITH, 1993).

T. vaginalis causa a tricomoníase humana, infecção sexualmente transmissível (IST) não viral, mais comum do planeta (WHO, 2022). *T. vaginalis* foi primeiramente descrita em 1836 em mulheres que apresentavam várias doenças no trato urogenital sendo, a maioria delas, prostitutas (DONNÉ, 1836). Acreditava-se, então, que se tratava de doença exclusivamente do sexo feminino. A tricomoníase só foi descrita em homens em 1894.

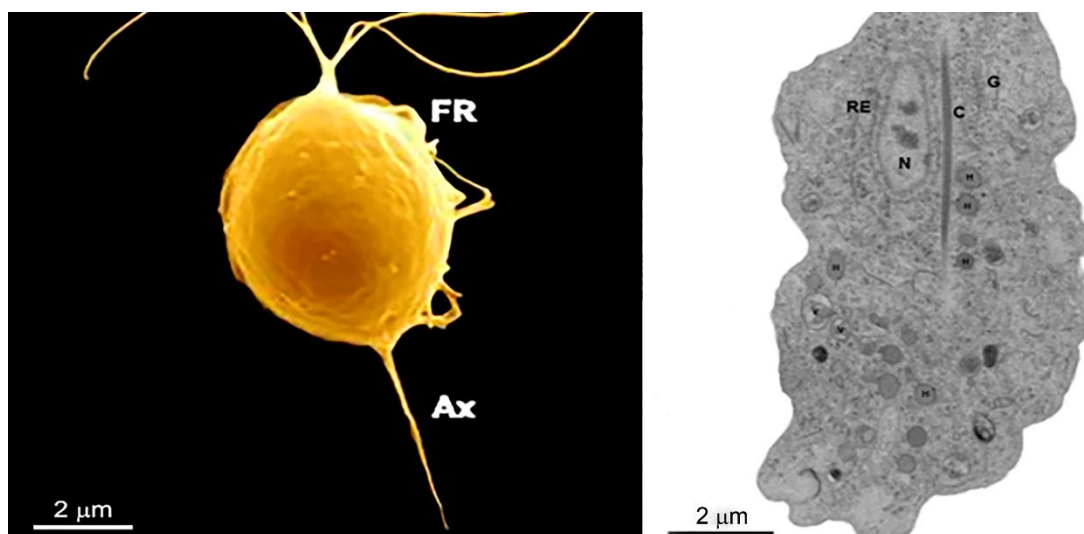


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura **(a)** e de transmissão **(b)** de *T. vaginalis*. FA, flagelo anterior; FR, flagelo recorrente; Ax, axóstilo; H, hidrogenossomos; N, núcleo; G, Golgi; C, costa; RE, Retículo endoplasmático; V, vacúolos; F, flagelo. **(a)** Imagem de M. Benchimol colorizada pelo Photoshop.

378 **1.2 Epidemiologia**

379 As ISTs são causadas por diferentes microrganismos como bactérias,
380 vírus e parasitas, sendo transmitidas principalmente através do contato sexual
381 vaginal, oral ou anal (WAGENLEHNER *et al.*, 2016). A Organização Mundial da
382 Saúde, em 2020, estimou 376 milhões de novos casos globais de ISTs entre
383 indivíduos em idade reprodutiva, entre elas, a tricomoníase, que é a IST
384 curável mais prevalente no mundo, responsável por quase metade desses
385 casos (156 milhões) (WHO, 2022) (**Tabela 1**). Ainda assim, esses dados
386 epidemiológicos podem ser subestimados devido ao alto número de pacientes
387 assintomáticos, à baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos usados em
388 muitas regiões e ao fato de que a infecção por *T. vaginalis* não é uma doença
389 de notificação obrigatória. A tricomoníase foi incluída na lista de infecções
390 parasitárias negligenciadas (IPN) pelo Centro de Controle e Prevenção de
391 Doenças (CDC) (IBÁÑEZ-ESCRIBANO e NOGAL-RUIZ, 2024). Segundo a
392 OMS a prevalência da tricomoníase em mulheres e homens foi de 5,3% e
393 0,6%, respectivamente, em todo o mundo (WHO, 2022). A prevalência e a
394 incidência da infecção por *T. vaginalis* variam geograficamente. Uma maior
395 incidência foi encontrada na África (20,2% das mulheres, 2% dos homens) e
396 nas Américas (22% das mulheres, 2,2% dos homens). A prevalência na Europa
397 foi estimada em 5,8% das mulheres e 0,6% dos homens (OMS, 2022;
398 ROWLEY *et al.*, 2019).

399 De acordo com o CDC dos Estados Unidos, o impacto anual das ISTs
400 em 2018 no sistema de saúde norte-americano foi de quase 16 bilhões de
401 dólares em custos médicos. Apesar dos tratamentos atuais disponíveis, o
402 diagnóstico de *T. vaginalis* pode ser difícil, pois não está igualmente disponível
403 em todo o mundo, sendo mais problemático em regiões com poucos recursos.
404 O aumento no número de infecções persistentes tem sinalizado para a
405 ocorrência de resistência parasitária, preocupando o sistema de saúde (DA
406 SILVA PINTO *et al.*, 2023).

410 **Tabela 1. Estimativas globais de novos casos de ISTs curáveis**

Gonorreia	87
Tricomoniase	156

Fonte: OMS, 2022.

1.3. Manifestações clínicas

Os sintomas da tricomoniase são mais comuns no sexo feminino do que no masculino, variando desde um quadro assintomático à infertilidade (LEWIS, 2010; MIELCZAREK e BLASZKOWSKA, 2016). Quando sintomática, há presença de corrimento amarelo-esverdeado com forte odor, prurido, irritação e descamação do epitélio vaginal (FICHOROVA, 2009). Em casos mais severos, pode ocorrer a presença de pontos hemorrágicos na vagina e cérvix, conhecido como “cérvix em morango” podendo também haver mudanças no pH vaginal, além do aumento da vascularização da vulva, desencadeando a hiperplasia do epitélio cervical (SWYGARD *et al.*, 2004). A doença também pode levar a maior predisposição a infecção pelo vírus HIV e ao câncer cervical (SECOR, 2012; HIRT, 2013).

Nos períodos menstrual e gestacional os sintomas se tornam mais acentuados devido à presença de ferro da menstruação e às flutuações hormonais desse período (RYU *et al.*, 2001). As mulheres grávidas portadoras da tricomoniase apresentam maior chance de distúrbios durante a gravidez, como parto prematuro e ruptura prematura de membranas placentárias (aborto espontâneo) (HIRT, 2013). Além disso, recém-nascidos podem apresentar baixo peso ao nascer (KISSINGER, 2015; SMITH *et al.*, 2017; MUDAU *et al.* 2018), morbidade e mortalidade neonatal (KISSINGER *et al.* 2015). A tricomoniase, inclusive, pode ser transmitida a recém-nascidos durante o parto (KISSINGER 2015; AKBARI e MATINI 2017).

Em homens a infecção é geralmente assintomática, o que dificulta seu diagnóstico, tornando-os carreadores de *T. vaginalis*. Entretanto, em casos mais severos, podem ocorrer inflamações na uretra e próstata (SECOR, 2012),

causando irritação uretral, secreção ou leve queimação após urinar ou ejacular, além de inchaço da próstata (REIN, 2020). Esse parasita é capaz de fagocitar espermatozoides sendo, provavelmente, um dos motivos da infertilidade em homens (BENCHIMOL *et al.*, 2008). Há relatos na literatura da relação entre o câncer de próstata e infecção por *T. vaginalis*, (SUITCLIFFE *et al.*, 2006). *T. vaginalis* estaria relacionada à prostatite crônica podendo culminar em câncer de próstata agressivo, conforme observado a partir do aumento dos níveis de antígeno específico (SUITCLIFFE *et al.*, 2006).

1.4. Diagnóstico

O diagnóstico é feito através da sintomatologia clínica e do exame ginecológico de rotina, por meios de “swabs” vaginais. A observação direta ao microscópio óptico traz dificuldades uma vez que apresenta uma mistura de muco vaginal e bactérias. Outro método é o cultivo da amostra, onde se observa a presença do organismo após 1 a 2 dias em um meio de cultura apropriado (HOBBS e SEÑA, 2013). Apesar da montagem úmida ser um método barato e rápido, seu uso é limitado. Ainda que a especificidade deste método seja de 100%, sua sensibilidade é baixa, variando de 44 a 68% em comparação com o método de cultivo da amostra (VAN GERWEN *et al.*, 2023). Além disso, a exigência de um microscópio e de um microscopista experiente representa um desafio para o diagnóstico da tricomoníase em ambientes com poucos recursos (VAN GERWEN *et al.*, 2023). Embora o método de cultivo da amostra seja mais preciso, sua demora e a necessidade do meio de cultura específico torna esse exame pouco utilizado (HOBBS e SEÑA, 2013).

As opções para o diagnóstico de *T. vaginalis* cresceram bastante na última década. Métodos mais rápidos como múltiplos testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs - *Nucleic Acid Amplification Test*) no local de atendimento são altamente sensíveis e se mostraram eficazes, mas apresentam um custo elevado (VAN GERWEN *et al.*, 2023). Apesar de já existirem testes de amplificação de ácido nucléico (NAATs) e testes de diagnóstico específicos para homens e mulheres (MUZNY *et al.*, 2019), a maior

parte das infecções assintomáticas por *T. vaginalis* continuam não identificadas e não tratadas (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). Após coleta, o material é colocado na plataforma de teste, o ensaio Xpert® TV fornece os resultados em 60–90 minutos, possibilitando o diagnóstico e gerenciamento de ponto de atendimento (POC) (SCHWEBKE *et al.*, 2018).

O OSOM® *Trichomonas* Rapid Test (Sekisui, Framingham, MA) é um ensaio imunocromatográfico de detecção de antígeno qualitativo com um tempo 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® TV Assay (SHEELE *et al.*, 2019), no entanto, atualmente é recomendado somente para mulheres (WORKOWSKI, 2015). Por não depender de nenhum equipamento altamente específico e ser de baixo custo, o teste OSOM® é interessante no cenário de campanhas de teste de ISTs em locais com poucos recursos (GARRETT *et al.*, 2018).

Para prevenir a tricomoníase é necessário usar preservativo em todas as relações sexuais (vaginais, orais ou anais). É a forma mais eficaz de evitar uma infecção sexualmente transmissível (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

1.5. Morfologia

As *Trichomonas* são protozoários eucariotos, unicelulares que apresentam aspecto piriforme quando em cultura axênica (GRANGER *et al.*, 2000). Quando em condições normais, o parasito apresenta os cinco flagelos externalizados, sendo estes relacionados à movimentação da célula. Quando

em contato com a célula hospedeira o parasito geralmente adquire forma ameboide, aumentando sua superfície de contato com a célula (PEREIRA-NEVES e BENCHIMOL, 2007). Quando se encontra em condições de estresse, que podem ser por privação de nutrientes, variações de temperatura ou durante tratamento com drogas, as *Trichomonas* apresentam forma arredondada, com seus flagelos total ou parcialmente internalizados e são denominadas formas endoflagelares ou pseudocistos (Fig. 2). Quando a situação se torna novamente favorável essa forma é reversível, os flagelos são externalizados e o parasita volta a ser piriforme (GRANGER *et al.*, 2000; PEREIRA-NEVES *et al.*, 2003).

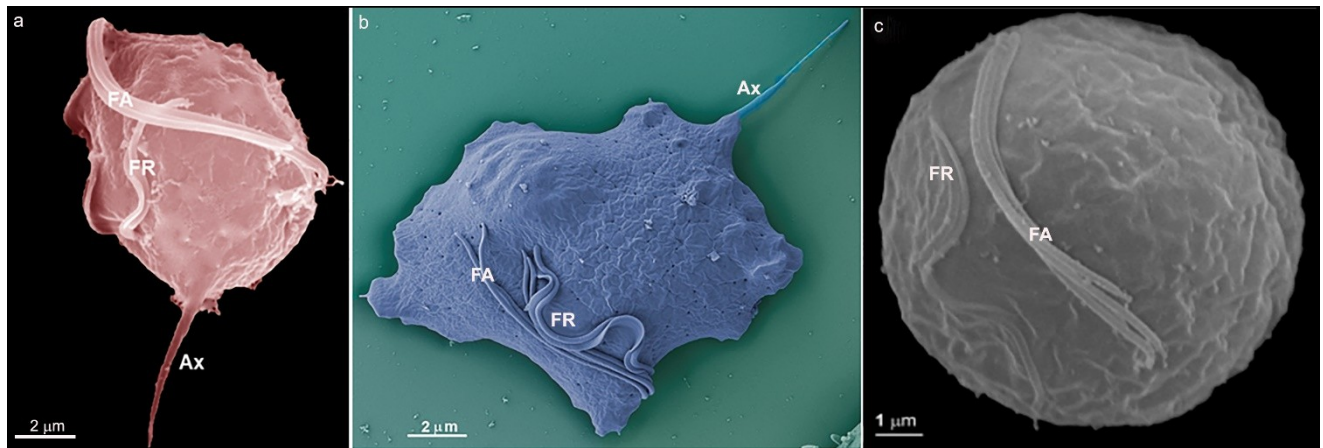


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de *T. vaginalis* de suas diferentes morfologias. **(a)** Piriforme, **(b)** ameboide, **(c)** pseudocisto ou forma endoflagelar. FA, flagelos anteriores; FR, flagelo recorrente; Ax, axóstilo. **(b e c, M. Benchimol).**

1.6. Ultraestrutura

T. vaginalis possui organelas comuns aos eucariotos superiores e algumas estruturas peculiares (Fig. 3), que serão abordadas em seguida.

1.6.1. Superfície Celular

A superfície celular inclui a membrana plasmática e o glicocálice. Diferentes carboidratos, como o ácido siálico, manose, galactose, N-acetilglicosamina e N-acetil-galactosamina foram encontrados na superfície das

tricomonas, assim como nas membranas de compartimentos intracelulares (BENCHIMOL *et al.*, 1981, BENCHIMOL *et al.*, 1982; BENCHIMOL e BERNARDINO, 2002). Inicialmente, através de técnicas como microscopia eletrônica de transmissão convencional e por métodos citoquímicos, a organização da membrana plasmática nos tricomonadídeos foi descrita (SIMPSON e WHITE, 1964; HONIGBERG *et al.*, 1971). Entretanto, somente após técnicas de congelamento celular e criofratura é que foi possível observar informações detalhadas da ultraestrutura da membrana plasmática do parasita e as especializações com arranjos de proteínas intramembranares que ocorrem nas membranas que cobrem os flagelos sob a forma de rosetas nos flagelos anteriores e colar no flagelo recorrente (BENCHIMOL *et al.*, 1981; BENCHIMOL *et al.*, 1982).

1.6.2. Organelas

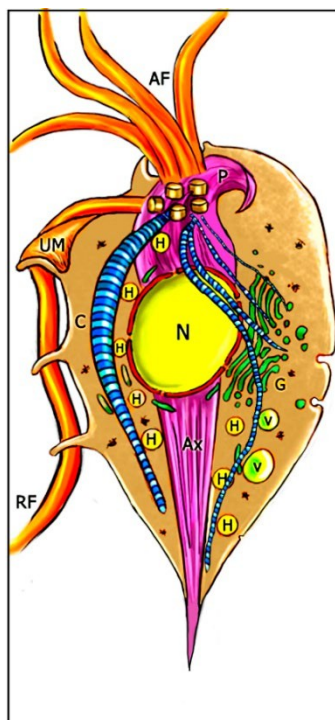


Figura 3. Esquema de *T. vaginalis* indicando suas estruturas internas. AF, flagelos anteriores; RF, flagelo recorrente; UM, membrana ondulante; C, costa; P, pelta; Ax, axóstilo; N, núcleo; H, hidrogenossomos; G, complexo de Golgi; V, vacúolos (M. Benchimol).

1.6.2.1. Retículo Endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) em tricomonadídeos, assim como as células de eucariotos superiores, é normalmente encontrado próximo ao núcleo, constituindo a membrana externa do envoltório nuclear (BENCHIMOL e De SOUZA, 1985; QUEIROZ *et al.*, 1991). Esta organela também pode ser visualizada como perfis dispersos em outros locais do citoplasma, como por exemplo, próximos aos hidrogenossomos. Estudos demonstraram que o RE pode estar relacionado à formação da vesícula periférica dessas organelas (BENCHIMOL e DE SOUZA, 1985; BENCHIMOL *et al.*, 1996B; BENCHIMOL *et al.*, 2000; BENCHIMOL, 2008). Estudos citoquímicos realizados em *Trichomonas foetus*, um tricomonadíneo que infecta o gado, demonstraram a presença de cálcio no RE, sugerindo que essa organela possa atuar como reservatório deste íon (BENCHIMOL *et al.*, 1982c; DE SOUZA e BENCHIMOL, 1985). Estudos mostraram que sob tratamento de drogas, o RE pode envolver organelas afetadas, como os hidrogenossomos por exemplo, em um típico processo de autofagia (BENCHIMOL *et al.*, 1996b).

1.6.2.2. Complexo de Golgi e filamentos parabasais

Diferentemente de outros parasitas as *Trichomonas* possuem o complexo de Golgi bem desenvolvido. (BENCHIMOL, 2004). Ao contrário do que ocorre em eucariotos superiores, durante o processo de divisão celular o complexo de Golgi em *Trichomonas* não se fragmenta (BENCHIMOL *et al.*, 2001). A divisão dessa organela ocorre por golgicineze, onde o Golgi se alonga e se divide em dois sendo essas duas unidades distribuídas para as duas células filhas (BENCHIMOL *et al.*, 2001).

Os filamentos parabasais se encontram associados ao complexo de Golgi, formando o aparelho parabasal (HONIGBERG e BRUGEROLLE, 1990). Dois filamentos parabasais foram descritos em *T. foetus* (HONIBERG *et al.*, 1971) enquanto em *T. vaginalis* seriam 4 (BENCHIMOL *et al.*, 2024, no prelo). Estas estruturas são cilíndricas, constituídas por proteínas e apresentam periodicidade (VISCOGLIOSI e BRUGEROLLE, 1994a). Em *T. vaginalis* estão localizados próximos a face cis (dois filamentos) e trans (outros dois filamentos

parabasais) do complexo de Golgi. Estudos sugerem que os filamentos parabasais estão relacionados com a sustentação e migração do complexo de Golgi durante a mitose (BENCHIMOL *et al.*, 2001).

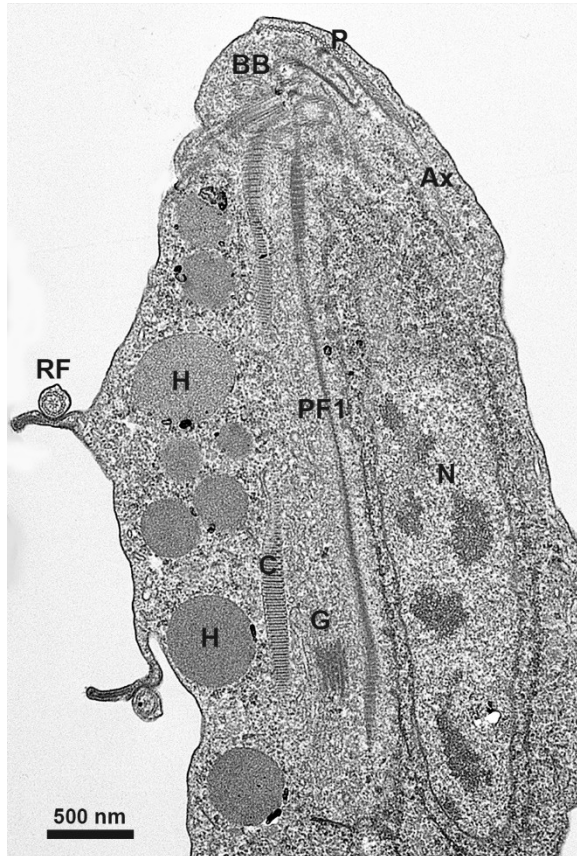


Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão de *T. vaginalis* indicando suas estruturas internas. BB, corpúsculo basal; P, pelta; RF, flagelo recorrente; Ax, axóstilo; H, hidrogenossomos; PF1, filamento parabasal 1; N, núcleo; C, costa; G, Golgi. (M. Benchimol).

1.6.2.3. Vacúolos e Lisossomos

O citoplasma das tricomonas contém uma grande variedade de vacúolos/vesículas de diversos tamanhos que fazem parte do processo endocítico da célula. Esse processo pode ser observado com o uso de diferentes marcadores, como a peroxidase e várias proteínas conjugadas a ouro como albumina, transferrina e lectinas (BENCHIMOL *et al.*, 1986, 1990; AFFONSO *et al.*, 1994; 1997). A digestão intracelular de materiais oriundos do meio externo, como leveduras (PEREIRA-NEVES e BENCHIMOL, 2007) e

bactérias (BENCHIMOL e DE SOUZA, 1995) acontece nos lisossomos. Esta organela em tricomonádídeos encontram-se predominantemente na região posterior da célula, apesar de não existir uma região preferencial para a atividade endocítica do parasita (AFFONSO *et al.*, 1994, 1997; BENCHIMOL e DE SOUZA, 1995).

1.6.2.4. Hidrogenossomos

Os tricomonádídeos não apresentam mitocôndrias, mas possuem uma organela incomum e importantíssima: os hidrogenossomos. O nome desta organela foi proposto por Lindmark e Müller (1973) devido sua função de produzir hidrogênio molecular e ATP, em um processo no qual o piruvato ou o malato são oxidados, resultando na produção de ATP, crucial para o metabolismo energético celular (MÜLLER, 1993; TACHEZY *et al.*, 2022).

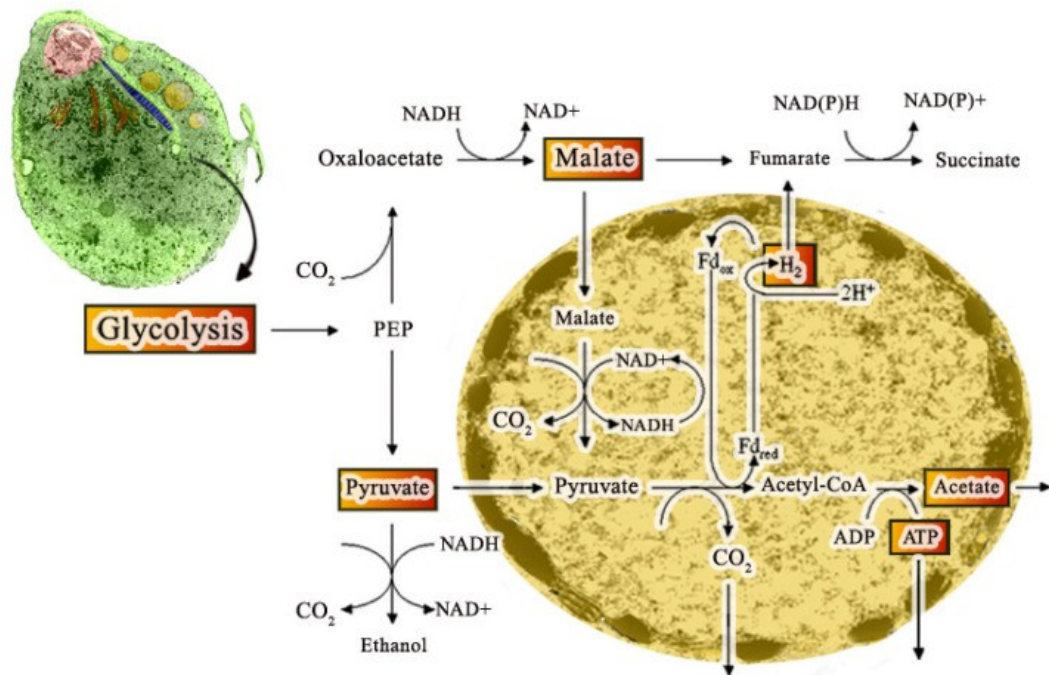


Figura 5. Esquema do ciclo metabólico que ocorre no hidrogenossomo. Após a glicólise no citosol, o piruvato entra no hidrogenossomo. O malato também é utilizado após sua descarboxilação em piruvato. Dentro do hidrogenossomo, o piruvato é descarboxilado oxidativamente em acetil coenzima A e CO₂, catalisado por uma proteína ferro-enxofre, PFOR. A ferredoxina reduzida é reoxidada pela hidrogenase

em uma reação que reduz prótons a hidrogênio molecular. Como resultado, ATP e acetato são produzidos (BENCHIMOL, 2008).

Os hidrogenossomos em *T. vaginalis* são esféricos e medem cerca de 400-500 nm de diâmetro. Além disso, possuem dupla membrana, que se encontram justapostas (BENCHIMOL *et al.*, 1996; BENCHIMOL *et al.*, 2022). Apresentam também, vesículas periféricas, de diversos tamanhos que variam de acordo com a quantidade de cátions de magnésio, fosfato e cálcio a serem estocados, sendo assim, importante no processo de regulação intracelular de cálcio (RIBEIRO *et al.*, 2001; BENCHIMOL *et al.*, 2022). Estudos realizados através de técnicas por microanálise de raios-X, identificaram a presença de íons no interior da vesícula, como íons de cálcio, zinco e magnésio (RIBEIRO *et al.*, 2001; BENCHIMOL *et al.*, 2022), além do fósforo, que estaria sob a forma de pirofosfatos (CHAPMAN *et al.*, 1985). Ribeiro *et al.* (2001) também demonstraram a presença de cobalto e alumínio nesta vesícula (BENCHIMOL *et al.*, 2022).

Os hidrogenossomos encontram-se preferencialmente associados aos grânulos de glicogênio e estruturas do citoesqueleto como por exemplo, a costa e o axóstilo (BENCHIMOL *et al.*, 2000). Estudos na literatura mostram que há uma relação entre os hidrogenossomos e o retículo endoplasmático, o que sugere um fornecimento de lipídios para o crescimento dos hidrogenossomos (BENCHIMOL *et al.*, 1996; BENCHIMOL *et al.*, 2000; BENCHIMOL *et al.*, 2022).

A origem dos hidrogenossomos ainda é motivo de grande debate. Algumas similaridades entre os hidrogenossomos e as mitocôndrias foram descritas, tanto bioquimicamente como estruturalmente, indicando um grau de proximidade evolutiva entre as duas organelas. Diversas hipóteses foram levantadas a fim de explicar a origem dos hidrogenossomos. Atualmente, acredita-se na hipótese que os hidrogenossomos e mitocôndrias evoluíram de um ancestral comum a partir da mesma organela progenitora (EMBLEY, 2006; TACHEZY *et al.*, 2022).

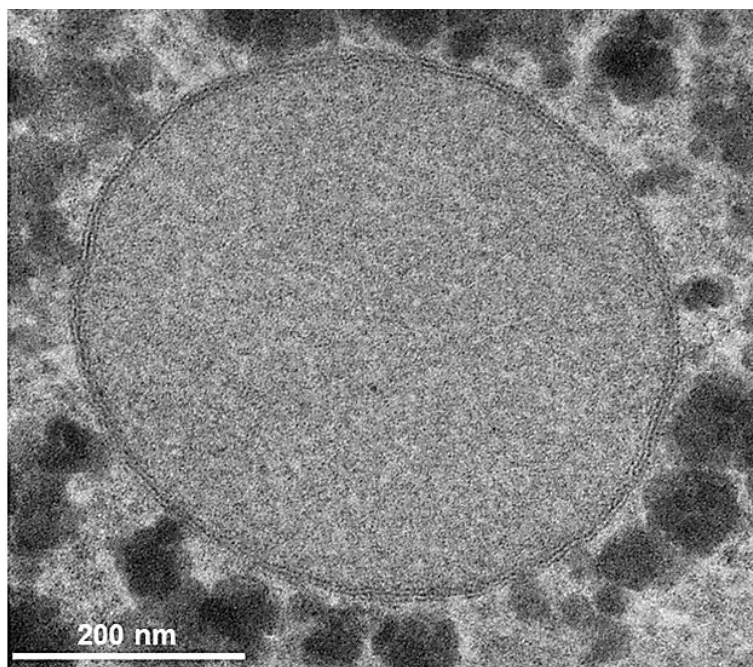
Os hidrogenossomos apresentam algumas características similares com as mitocôndrias, por exemplo: (1) o mecanismo de divisão, que ocorre por

659 partição ou segmentação; (2) participam na produção de ATP pelo
660 metabolismo do piruvato; (3) possuem dupla membrana (BENCHIMOL *et al.*,
661 1982); (4) apresentam enzimas translocases na sua membrana interna (5)
662 possuem cardiolipina, fosfolipídio presente em membranas bacterianas e
663 membrana interna das mitocôndrias (ROSA *et al.*, 2006); (6) participam do
664 sequestro de íons de cálcio (RIBEIRO *et al.*, 2001). Porém, as mitocôndrias e
665 os hidrogenossomos também se diferenciam em alguns aspectos, como por
666 exemplo: os hidrogenossomos não possuem: (1) DNA nem ribossomos
667 (CERKASOVÁ *et al.*, 1976), (2) citocromos, (3) enzimas do ciclo de Krebs e
668 (4) nem F₀-F₁ ATPase (LLOYD *et al.*, 1979). Além do mais, os
669 hidrogenossomos apresentam enzimas que as mitocôndrias não possuem,
670 como a hidrogenase (BUI e JOHNSON, 1996) e a piruvato-ferredoxina oxido-
671 redutase (HRDÝ e MÜLLER, 1995; TACHEZY *et al.*, 2022).

672 A translocase da membrana externa (TOM) localizada na membrana
673 externa mitocondrial, que desempenha um papel fundamental na importação
674 de proteínas e na biogênese da organela, é altamente divergente nos
675 hidrogenossomos de *Trichomonas*. Apesar da distância evolutiva, o complexo
676 TOM (TvTOM) em *T. vaginalis* tem uma estrutura conservada de poros triplos,
677 mas com uma forma única semelhante a um crânio, sugerindo que o TOM na
678 mitocôndria inicial poderia ter formado três poros (MAKKI *et al.*, 2019 e
679 TACHEZY *et al.*, 2022).

680 Os hidrogenossomos têm sido importantes para estudos de tratamento
681 com drogas (BENCHIMOL *et al.*, 2022). O fato dos hidrogenossomos estarem
682 presentes em organismos unicelulares e em alguns fungos e ausentes em
683 células de mamíferos, tem despertado o interesse desta organela como alvo
684 potencial para novos medicamentos no tratamento da tricomoníase
685 (BENCHIMOL, 2008; BENCHIMOL *et al.*, 2022). Muitos estudos têm mostrado
686 que o tratamento de tricomonas com drogas como, metronidazol beta-
687 Lapachona, colchicina, Taxol, nocodazol, griseofulvina, citocalasinas,
688 hidroxauréia, zinco, peróxido de hidrogênio, SQ109 entre outras, provocam
689 alterações severas nos hidrogenossomos, o que resultaria na morte dos
690 parasitos (BENCHIMOL *et al.*, 1993; BENCHIMOL *et al.*, 1996a; BENCHIMOL,
691 1999; BENCHIMOL, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2001; MARIANTE *et al.*, 2003;

692 HRDÝ *et al.*, 2005; BENCHIMOL, 2008; BENCHIMOL *et al.*, 2022; DE SOUZA
693 *et al.*, 2023).



694
695
696
697

Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão de um hidrogenossomo de *T. vaginalis*. Nota-se a dupla membrana e o formato esférico da organela.

698 1.6.2.5. Núcleo e divisão 699

700 Os tricomonadídeos apresentam um único núcleo localizado na parte
701 anterior da célula (Fig. 3). O envoltório nuclear, assim como em eucariotos
702 superiores, é constituído por duas membranas onde a parte externa é o RE
703 enquanto a membrana interna está voltada para a matriz nuclear (BENCHIMOL
704 *et al.*, 1982A; BENCHIMOL, 2004).

705 A divisão celular nos tricomonadídeos é por mitose fechada, com fuso
706 extranuclear. Não ocorre a fragmentação do envoltório nuclear, sendo
707 denominada de pleuromitose (BRUGEROLLE *et al.*, 2000). Durante a fase pré-
708 mitótica, todas as estruturas do citoesqueleto como a costa, complexo pelta-
709 axóstilo, corpúsculos basais, flagelos e filamentos parabasais se duplicam. Na
710 prófase, a célula fica um pouco maior, porém ainda piriforme. Durante a
711 metáfase, os corpúsculos basais migram para polos opostos, em seguida
712 ocorre a migração das outras estruturas do citoesqueleto. Antes de entrar em
713 anáfase, os axóstilos migram para os polos opostos da célula, auxiliados pelo

batimento dos flagelos anteriores (RIBEIRO *et al.*, 2000; 2002a; 2002b). Estudos mostraram que durante a mitose, o axóstilo desempenha um papel fundamental: participando das mudanças na forma da célula, contorção da região anterior da célula e cariocinese (BENCHIMOL, 2004). Durante a anáfase, a célula adquire uma forma mais alongada e ocorre a cariocinese. A telófase é caracterizada pela citocinese, os núcleos migram e ficam distantes, formando-se duas células filhas (BENCHIMOL, 2004). Estudos indicam que os movimentos dos flagelos sugerem auxiliar a citocinese (RIBEIRO *et al.*, 2000; 2002a; 2002). A mitose é finalizada quando as duas pequenas células-filhas se separam em suas extremidades posteriores e recuperam o movimento celular normal (BENCHIMOL, 2004). O mecanismo de segregação dos cromossomos das tricomonas ainda não foi elucidado.

Estudos sobre sequenciamento do genoma de *T. vaginalis* demonstraram que apresenta 160-Mb, sendo capaz de codificar em média 60.000 proteínas, muito maior do que o de muitos outros protozoários, como giardias, tripanosomas, plasmódios e amebas (CARLTON *et al.*, 2007).

1.6.3. Citoesqueleto

O citoesqueleto dos tricomonadíneos é formado por diversas estruturas proteicas muitas das quais ainda não foram bem elucidadas. Entre as principais citamos o complexo pelta-axóstilo, os flagelos (*T. vaginalis* possui quatro flagelos anteriores e um recorrente), a costa, os filamentos parabasais, os corpúsculos basais e seus filamentos associados, de onde surgem os flagelos e as demais estruturas relacionadas a movimentação do parasito (HONIGBERG *et al.*, 1971; RIBEIRO *et al.*, 2000). Também apresentam diversas estruturas pouco conhecidas como os filamentos sigmóides, o filamento X e as estruturas associadas aos corpúsculos basais, entre outras, que ainda têm suas funções desconhecidas (BENCHIMOL, 2004).

1.6.3.1. Complexo Pelta-Axóstilo

O axóstilo é constituído por microtúbulos longitudinais de uma extremidade a outra da célula (BENCHIMOL *et al.*, 2000) (Fig. 3). Ele

desempenha um papel importante como uma estrutura axial e durante a divisão celular, participa do processo de cariocinese promovendo a constrição do núcleo (RIBEIRO *et al.*, 2001). A pelta é uma estrutura também formada por microtúbulos encontrada na região anterior da célula e apresenta continuidade com o axóstilo. A pelta apresenta como principal função sustentar o canal periflagelar, local em que os flagelos emergem (RIBEIRO *et al.*, 2000) (Fig. 3).

1.6.3.2. Corpúsculos basais e flagelos

T. vaginalis apresenta cinco corpúsculos basais, quatro deles originam os flagelos anteriores e um deles o flagelo recorrente. O corpúsculo basal apresenta nove tripletes de microtúbulos, mas não possui um par central, como nos flagelos. Estudos indicaram a presença de diferentes fibras que estão associadas a esta estrutura (VISCOGLIOSI e BRUGEROLLE, 1994b).

Os flagelos em tricomonas, bem como de eucariotos, apresentam um arranjo de microtúbulos 9+2 (sendo nove pares de microtúbulos periféricos e um par central). Através de estudos por técnicas como criofratura e *freeze-etching* em *T. foetus* foi demonstrado que a membrana dos flagelos anteriores possui 9 a 12 partículas intramembranas formando rosetas (BENCHIMOL *et al.*, 1981). Estudos indicaram que todos os flagelos participam do movimento da célula (MONTEIRO-LEAL *et al.*, 1995). Além disso, também foi observado que os flagelos anteriores possuem batimentos ciliares diferentemente dos encontrados no flagelo recorrente (MONTEIRO-LEAL *et al.*, 1995).

1.6.3.4 Costa

A costa é uma estrutura proteica com periodicidade que está associada à membrana ondulante do parasita, diminuindo a pressão mecânica causada pelo intenso batimento do flagelo recorrente (BENCHIMOL, 2004). Constituída por proteínas básicas, apresenta bandas claras e escuras de diferentes espessuras (BENCHIMOL *et al.*, 1982). A costa é classificada de acordo com seu padrão periódico, *T. vaginalis* possui um padrão de estriação da costa tipo B, semelhante a "espinhas de peixe", diferente do padrão de estriação da costa de *T. foetus*, denominada como costa tipo A, quando as bandas estão

organizadas paralelamente (HONIBERG *et al.*, 1971). Estudos utilizando técnicas de fracionamento celular, proteômica, microscopia eletrônica de alta resolução e espectrometria de massa mostraram que a costa de *T. foetus* apresenta uma organização estrutural bastante complexa com diferentes padrões de estrias regulares e uma região central amorfa. Além disso, estes estudos também mostraram que esta estrutura é composta por proteínas únicas (DE ANDRADE ROSA *et al.*, 2017). Recentemente foi caracterizada pela primeira vez, uma proteína pertencente à costa de *T. foetus*, um protozoário patogênico que afeta gado e felinos. Esta proteína foi denominada como costain 1 (BANDEIRA e DE SOUZA 2022). Posteriormente, em um trabalho do mesmo grupo foi possível, a partir da recente técnica de microscopia de expansão (ExM), visualizá-la de modo específico na costa do parasito. Além disso, com o uso dessa técnica foi possível observar pela primeira vez por imunofluorescência, os microtúbulos individualizados de ambas as espécies de *T. foetus* e *T. vaginalis* (BANDEIRA *et al.*, 2023).

1.7. Interação-parasito hospedeiro e patogenicidade

Pouco se conhece sobre os mecanismos das interações parasito-hospedeiro, apesar da alta incidência de tricomonas em diversas espécies. As tricomonas não penetram no epitélio, portanto, são considerados parasitos não-invasivos, extracelulares (RASMUSSEN *et al.*, 1986; GONZÁLES-ROBLES *et al.* 1995). Como já bem descrito na literatura o parasito quando se adere às células epiteliais forma interdigitações e assume uma mudança drástica em sua morfologia, passando à forma ameboide (PEREIRA-NEVES e BENCHIMOL, 2007) (Fig. 6), sendo este sugerido como um sinal de virulência (ARROYO *et al.*, 1993). Isso poderia estar relacionado a uma maior superfície de adesão entre as duas células, estando as duas membranas conectadas de maneira tão íntima que parecem estar em continuidade em alguns pontos (FURTADO E BENCHIMOL, 1998). No entanto, trabalho recente de injeção com marcadores fluorescentes não encontraram comunicação entre as células (ORTIZ *et al.*, 2023).

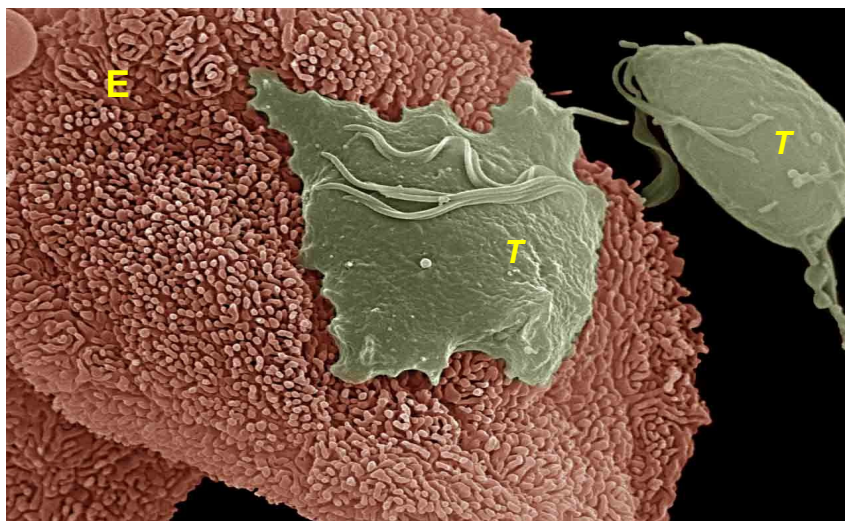


Figura 7. *T. vaginalis* aderida à célula epitelial vaginal apresentando morfologia amebóide (foto de Pereira-Neves e Benchimol). **E**, epitélio; **T**, *T. vaginalis*.

Para que ocorra o estabelecimento da tricomoníase, o parasito inicialmente deve ultrapassar a barreira do muco para poder interagir com o epitélio vaginal (ALDERETE e GARZA, 1988). Isso parece estar relacionado ao movimento dos flagelos e a ação de enzimas proteolíticas, denominadas mucinases, que vão digerir o muco que reveste o epitélio vaginal, até que os parasitos consigam acesso às células epiteliais vaginais (LEHKER e SWEENEY, 1999).

Muitos pesquisadores alegam que os danos provocados pelos parasitos ocorrem através de um processo direto e dependente do contato com a célula hospedeira, sendo este um pré-requisito crucial para a citotoxicidade (GONZÁLES-ROBLES *et al.*, 1995; BURGESS *et al.*, 1990; SINGH *et al.*, 2004). No entanto, alguns estudos divergem e acreditam que proteases, entre outros produtos metabólicos, são liberados pelos parasitos no ambiente vaginal e que através destes, ocorram os efeitos citotóxicos nas células hospedeiras, não havendo necessidade do contato direto do parasito com as células vaginais (GARBER e LEMCHUK-FAVEL, 1989; PINDAK *et al.*, 1993). Entretanto, foi possível demonstrar após a realização de experimentos de interação, utilizando uma membrana permeável entre os parasitos e células hospedeiras, que o contato é necessário para que ocorra o efeito citotóxico (GILBERT *et al.*, 2000).

Foi sugerido que a adesão de *T. vaginalis* às células epiteliais ocorreria através de adesinas (APs) que são proteínas de superfície, cuja síntese é regulada pelo ferro, e pela atividade de proteinases. Essas proteínas denominadas AP65, AP51, AP33 e AP23, seriam capazes de reconhecer proteínas específicas do hospedeiro através de uma interação do tipo ligante receptor (ARROYO e ALDERETE, 1992; ARROYO *et al.*, 1993).

No entanto, o fato das adesinas serem consideradas ligantes exclusivos do processo de adesão às células epiteliais vaginais recebeu críticas por outros pesquisadores (RADA *et al.*, 2019). Estudos mostraram que genes dessas adesinas apresentaram homologia com enzimas hidrogenossomais como por exemplo, enzima málica e ambas as sub-unidades da enzima succinil CoA sintetase. Sendo assim, foi sugerido que essas proteínas poderiam apresentar funções múltiplas como ocorre em outros microrganismos (RADA *et al.*, 2019). Além disso, estudos demonstraram que as adesinas de tricomonas também são capazes de se ligar a diversos tipos celulares, como por exemplo, eritrócitos de diferentes espécies, *Mycoplasma hominis* e linhagens celulares como células Vero, CHO e HeLa (ADDIS *et al.*, 2000). Essas observações suscitaram suspeitas que a especificidade da adesão desse parasito ao epitélio vaginal poderia não ocorrer por estas adesinas.

Estudos em *T. foetus* demonstraram a ação mediadora de laminina e fibronectina no processo de interação. Experimentos utilizando partículas de poliestireno revestidas com diferentes tipos de proteínas em linhagem celular MDCK, demonstraram que a adesão do parasito foi intensificada pela laminina (SILVA FILHO e DE SOUZA, 1988). Há também estudos indicando que a adesão poderia ser mediada por glicoconjugados. Experimentos de inibição com açúcares competidores apresentaram uma diminuição significativa da adesão de *T. foetus* e *T. vaginalis* (BONILHA *et al.*, 1995).

Outra classe de moléculas que estaria diretamente relacionada com o mecanismo de adesão são as cisteíno-proteases (ARROYO e ALDERETE, 1989). Uma cisteíno-protease de 30 kDa (CP-30) foi achada intermediando processos citotóxicos de *T. foetus* em células epiteliais vaginais bovinas (SINGH *et al.*, 1999) e de *T. vaginalis* em células HeLa e epiteliais vaginais humanas (MENDONZA-LOPES *et al.*, 2000). Esta cisteíno-protease teria relação com o mecanismo de apoptose tanto das células vaginais bovinas

(SINGH *et al.*, 2004) como das células do endométrio bovino (SINGH *et al.*, 2005), agindo estrategicamente na modulação deste evento celular. Por estar relacionada com a degradação de proteínas da matriz extracelular, como a laminina e a fibronectina, a CP-30 intensificaria o mecanismo de citotoxicidade do parasito, sendo comprovada a sua ligação com as proteínas de matriz (SILVA-FILHO e DE SOUZA, 1988; BENCHIMOL *et al.*, 1990; CROUCH e ALDERETE, 1999). Por esse motivo, as tricomonas assumiriam um caráter mais infectivo e invasivo, pois a presença do parasito às camadas epiteliais profundas provocaria a esfoliação das camadas mais superficiais.

Dependendo da virulência da cepa, também pode ocorrer a ruptura do epitélio e de suas junções, atingindo a lâmina basal e causando múltiplas infecções (KRIEGER *et al.*, 1985; GAULT *et al.*, 1995; MADEIRO e BENCHIMOL, 2004). Neste local há uma baixa tensão de oxigênio o que propiciaria uma infecção bem-sucedida visto que o parasito é microaerófilo. Embora experimentos *in vitro* tenham mostrado a importância das cisteíno-proteases na adesão, seu papel também se mostrou relevante na modulação da resposta imune (FELLEISEN, 1999). Foi demonstrado que algumas cisteíno-proteases de *T. foetus* são capazes de clivar as imunoglobulinas IgG1 e IgG2 bovinas, que podem matar o parasito *in vitro* (CORBEIL, 1994; DE AZEVEDO E DE SOUZA, 1992; 1996). Pesquisadores sugerem que estas cisteíno-proteases são capazes de agir contra a resposta imune do hospedeiro, internalizando seus anticorpos após sua ligação, mecanismo este conhecido como mimetismo molecular (GRANGER E WARDWOOD, 1996).

Trabalhos anteriores mostraram que *T. vaginalis* não causa efeitos citotóxicos em células vaginais bovinas (SINGH *et al.*, 2004) e o inverso também não ocorreria com *T. foetus* em relação às células vaginais humanas (LOCKWOOD *et al.*, 1984; GILBERT *et al.*, 2000). Experimentos nos quais foram adicionados 20 extratos purificados de CP30 de *T. foetus* em células vaginais humanas, não detectou indução de apoptose, o mesmo também ocorreu com *T. vaginalis* em células vaginais bovinas (SINGH *et al.*, 2004). Esses autores sugeriram que ocorreria uma interação espécie-específica entre os parasitos e seus respectivos hospedeiros, onde *T. vaginalis* não seria capaz de infectar células epiteliais do trato reprodutivo bovino. No entanto, estudos posteriores utilizando videomicroscopia, microscopia eletrônica de varredura e

de transmissão, ensaios colorimétricos e citoquímica mostraram o efeito citopático de *T. vaginalis* em células epiteliais bovinas (MIDDLEJ E BENCHIMOL, 2009).

T. vaginalis foi capaz de atacar células bovinas formando grupos ao redor dela, acarretando danos à membrana plasmática da célula hospedeira e, consequentemente, morte celular. Após as lesões e lise na membrana observou-se que fragmentos de células necróticas foram fagocitados por *T. vaginalis*, mas células vivas ou intactas não foram ingeridas (MIDDLEJ E BENCHIMOL, 2009).

Estudos recentes relacionados aos mecanismos moleculares de interação de *T. vaginalis* aos tecidos da mucosa do hospedeiro sugerem que a aderência às células é complexa e multifacetada (tabela 2), com muitos fatores a serem identificados (HIRT et al., 2011; HIRT, 2013; FICHOROVA et al., 2016; MERCER e JOHNSON, 2018).

1.7.1 Microvesículas e exossomos de *T. vaginalis*

O termo “vesículas extracelulares” (VEs) foi estabelecido pela *International Society for Extracellular Vesicles* como estruturas secretadas de forma natural pelas células, sendo delimitadas por uma bicamada lipídica contendo proteínas e ácidos nucleicos (SALAS et al., 2023). VEs referem-se a todas as subpopulações de VEs e sua utilização deve ser coletiva e universal (THÉRY et al., 2018). A liberação de VEs foi descrita em diversos organismos como Archaea, proteobactérias, plantas, fungos, protozoários e animais, onde foi descrita a capacidade de liberação de uma ampla variedade de vesículas, como, por exemplo, exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos, apresentando variações de tamanho entre si (BOSE et al., 2020). Dentre os diversos subtipos de VEs existentes há três categorias principais conforme seu modo de biogênese, tamanho e função: **(1)** exossomos, **(2)** microvesículas (MVs) e **(3)** corpos apoptóticos. Os exossomos têm origem na invaginação da membrana plasmática e formação de corpos multivesiculares (MVB); seu tamanho varia de 40 a 100 nm. As microvesículas (MVs), também denominadas de micropartículas ou ectossomos, são provenientes do

brotamento e extrusão da membrana plasmática, com tamanhos entre 50 e 1000 nm e estrutura assimétrica (Fig. 8). Os corpos apoptóticos, com tamanhos de até 1000 nm, são oriundos de células apoptóticas (KALRA *et al.*, 2012; DE SOUZA e BARRIAS, 2020; SALAS *et al.*, 2023).

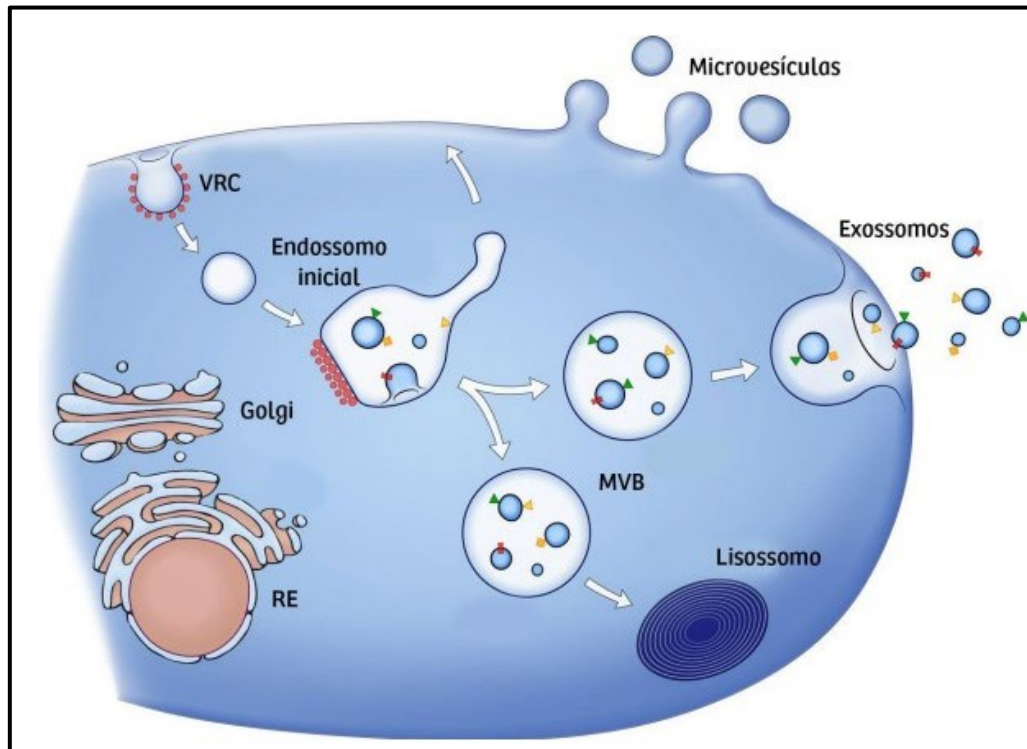


Figura 8. Representação esquemática da liberação de microvesículas e exossomos. Microvesículas são liberadas por evaginação da membrana plasmática, enquanto os exossomos são representados por pequenas vesículas de tamanhos variados que são formadas a partir da fusão de corpos multivesiculares, (MVBs) com a membrana plasmática. RE, retículo endoplasmático; VRC, vesícula revestida por clatrina (Adaptado de RAPOSO e STOORVOGEL, 2013).

O estudo das VEs é de suma importância, principalmente pelas funções com as quais estão relacionadas (NIEVAS *et al.*, 2018). São capazes de modular eventos de curta e longa distâncias, permitindo que as células se comuniquem. Participam e regulam processos fisiológicos, como coagulação sanguínea, diferenciação celular e inflamação, bem como processos patológicos causados por câncer, doenças neurológicas, cardiovasculares e infecciosas (KAO e PAPOUTSAKIS, 2019; RAPOSO E STOORVOGEL, 2013; SALAS *et al.*, 2023). As VEs também são importantes para a comunicação

entre patógenos e células hospedeiras (DRUREY E MAIZELS, 2021; NIEVAS *et al.*, 2020; SABATKE *et al.*, 2021; TORRECILHAS *et al.*, 2020). Estudos de VEs em *T. vaginalis* demonstraram que tanto exossomos quanto MVs são eficazes em distribuir seu conteúdo para as células hospedeiras, modulando a resposta imune dessas células. Além disso, a formação de VEs aumenta na presença de células hospedeiras e modulariam a adesão do parasita (NIEVES *et al.*, 2018; NIEVES *et al.*, 2020; RADA *et al.*, 2022; RAI E JOHNSON, 2019; SALAS *et al.*, 2023). Foi descrito que os exossomos de *T. vaginalis* contêm RNA, proteínas exossômicas conservadas e proteínas específicas de parasitas (TWU *et al.*, 2013). Foi reportado que a carga de RNA presente nas vesículas de *T. vaginalis* seria internalizada rapidamente por células humanas através de endocitose dependente de *lipid rafts*. Essa carga é majoritariamente constituída por pequenos RNAs reguladores (ARTUYANTS *et al.*, 2020). Também foi demonstrado que os exossomos de cepas muito aderentes têm potencial de aumentar os níveis de aderência em cepas pouco aderentes (OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2017). Um estudo recente com diferentes cepas de *T. vaginalis* mostrou que esses parasitas formam conexões celulares membranosas semelhantes a citonemas para se comunicarem (SALAS *et al.*, 2023). Além do mais, foi visto que a formação de citonemas de uma cepa de parasita menos aderente é afetada na presença de uma cepa mais aderente. Evidenciou-se que uma cepa de *T. vaginalis* pouco aderente passa a aderir mais fortemente às células da próstata na presença de uma cepa aderente (SALAS *et al.*, 2023), corroborando achados anteriores (OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2017). Um outro estudo caracterizou morfologicamente vesículas secretadas por *T. vaginalis* e foi possível observar possíveis danos causados durante a interação deste parasita com células epiteliais vaginais *in vitro* (ANDRADE, 2022).

Adicionalmente, foi demonstrado que a carga molecular de VEs produzidas por *Lactobacillus gasseri* e *Gardnerella vaginalis* modulariam a interação entre *T. vaginalis* e células hospedeiras. (ARTUYANTS *et al.*, 2023). Mais estudos são necessários para se compreender melhor o papel das VEs e suas implicações no processo de infecção desse parasita.

1.7.2. Nanotubos de tunelamento

Os nanotubos de tunelamento (TNTs) são projeções citoplasmáticas transitórias compostos por filamentos de actina, estendidos entre as células na forma de canais nanotubulares abertos, apresentando 50–200 nm de diâmetro (RUSTOM *et al.*, 2004). Vários tipos de células exibem finas saliências de membrana, que receberam diferentes nomes, como citonemas, extensões de membrana tunelamento de saliências semelhantes a nanotubos (TNT), pontes celulares, filopódios especializados e filopódios de sinalização (Revisado em Yamashita *et al.*, 2018). Foi sugerido que essas saliências realizariam algum papel em um novo mecanismo de comunicação intercelular direta.

Em *Trypanossoma brucei* foi demonstrado que os nanotubos membranosos são formados na região posterior da membrana flagelar, e, posteriormente, se diferenciam em VEs livres (Szempruch *et al.*, 2016). Em *T. foetus* um estudo utilizando microscopia de varredura de íons de hélio de alta resolução, bem como microscopia eletrônica de transmissão e células coradas negativamente demonstrou a presença de saliências finas (nanotubos), com diferentes tamanhos (27 nm a 81 nm de espessura) e vários comprimentos (de 73 nm a 2 µm) com o aspecto de estruturas bulbosas que brotam da superfície celular que não haviam sido descritas antes nesse parasita (Benchimol *et al.*, 2021). Em *T. vaginalis* foram encontradas estruturas finas semelhantes a nanotubos de tunelamento, com uma possível presença de material em vias de transporte, sugerindo mais um mecanismo que o parasito, provavelmente, utilizaria para ter sucesso como agente infeccioso. Foi observado que os parasitas projetam seus flagelos em direção às células epiteliais e parecem demonstrar uma forte adesão à estas células hospedeiras (ANDRADE, 2022).

1.8. Tratamento

O tratamento atual da tricomoníase humana consiste no uso do metronidazol 1-(2-hidroietil) -2-metil-5-nitroimidazol (MTZ), um composto bastante utilizado no tratamento de várias infecções provocadas por bactérias anaeróbicas como *Helicobacter*, *Bacteroides* e *Clostridium* e parasitas anaeróbicos ou aerotolerantes como *Trichomonas*, *Entamoeba* e *Giardia*

(EDWARDS, 1993). Na década de 1960, o metronidazol foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) para o tratamento da tricomoníase humana, demonstrando uma alta taxa de cura, chegando próxima a 100% (COSAR e JULOU, 1959). Quatro décadas depois, o uso do tinidazol foi aceito (FUNG E DOAN, 2005) e recentemente a FDA aprovou o uso do secnidazol nos Estados Unidos (MUZNY E VAN GERWEN, 2022; IBÁÑEZ-ESCRIBANO e NOGAL-RUIZ, 2024).

O MTZ, por ser uma molécula pequena, entra na célula por difusão passiva. O composto entra sob a forma inativa e através de reduções anaeróbicas, torna-se um composto ativo. Em protozoários como as *Trichomonas*, o metronidazol é reduzido nos hidrogenossomos pela ação da enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductase (Fig. 9), ocorre assim a formação de radicais nitro-citotóxicos levando à formação de radicais livres que oxidam a molécula de DNA do parasito levando o mesmo à morte (CHAPMAN *et al.*, 1985).

Embora eficaz, o MTZ causa muitos efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, tonturas, insônia, humor depressivo, alterações diversas no paladar, tremores, diarreia, dor de cabeça etc. (ROSA *et al.*, 2011). Em casos mais severos podem ocorrer pancreatite, leucopenia e neuropatias (LOSSICK, 1990). Estudos também mostraram que este composto é mutagênico em bactérias e carcinogênico em camundongos (CONNOR *et al.*, 1977; LINDMARK e MULLER, 1976). A FDA, inclusive, alerta para o potencial carcinogênico do metronidazol em ratos e camundongos, sendo seu uso veterinário restrito em alguns países (EUA e Europa) devido sua associação à carcinogênese (HERNÁNDEZ CERUELOS, 2019).

A segurança do uso do metronidazol durante a gravidez ainda é bastante controversa e não está bem elucidada (RIBEIRO *et al.*, 2013). Sendo justamente esse o período em que a infecção se torna mais acentuada devido às flutuações hormonais (ROCHA *et al.*, 2014). O uso de medicamentos durante a gravidez e lactação é um desafio para os profissionais de saúde, pois culmina em riscos não somente para a mulher, mas também para o embrião/feto (Ribeiro *et al.*, 2013).

A FDA classifica os medicamentos de acordo com os riscos associados durante a gravidez (SAHIN *et al.*, 2016). Esta classificação baseia-se

majoritariamente nos efeitos observados no primeiro trimestre de gravidez, visto que durante esse período ocorrem os mais importantes processos embriológicos, apresentando maior risco ao embrião/feto. (IRVINE *et al.*, 2010; MITCHELL *et al.*, 2011). O metronidazol está classificado na categoria B de risco para gravidez, o que indica que não há evidência de danos ao feto, todavia, não existem estudos adequados em mulheres grávidas (IRVINE *et al.*, 2010). Este composto atravessa a barreira placentária, penetra na circulação fetal e líquido amniótico (THOMPSON *et al.*, 2016), além disso, é amplamente distribuído atingindo todos os tecidos e fluidos corporais (VICENTE e PÉREZ-TRALLERO, 2010).

Estudos feitos em ratos sugerem que o MTZ estaria associado a embriofetalidade (MUDRY *et al.*, 2001). Além disso, o uso do MTZ vaginal na gravidez estaria associado à hidrocefalia congênita (KAZY *et al.*, 2005). Um estudo randomizado relacionado ao uso de medicamentos durante a gravidez, sugeriu que a terapia com o MTZ aumentaria a chance de partos prematuros (SHENNAN *et al.* 2006), e estaria relacionado ao aumento de abortos espontâneos (MUANDA *et al.*, 2017). Um outro estudo realizado em ratas prenhas, avaliou o efeito do MTZ no desenvolvimento placentário e fetal (DA SILVA *et al.*, 2019). Não houve indício de má-formação nos neonatos. No entanto, observou-se redução significativa no número e peso dos neonatos no grupo tratado com metronidazol, quando comparado ao grupo controle (DA SILVA *et al.*, 2019).

Esses estudos nos trazem um alerta sobre possíveis danos do metronidazol ao embrião/feto. Mais pesquisas são necessárias para melhor esclarecer os riscos da exposição ao metronidazol.

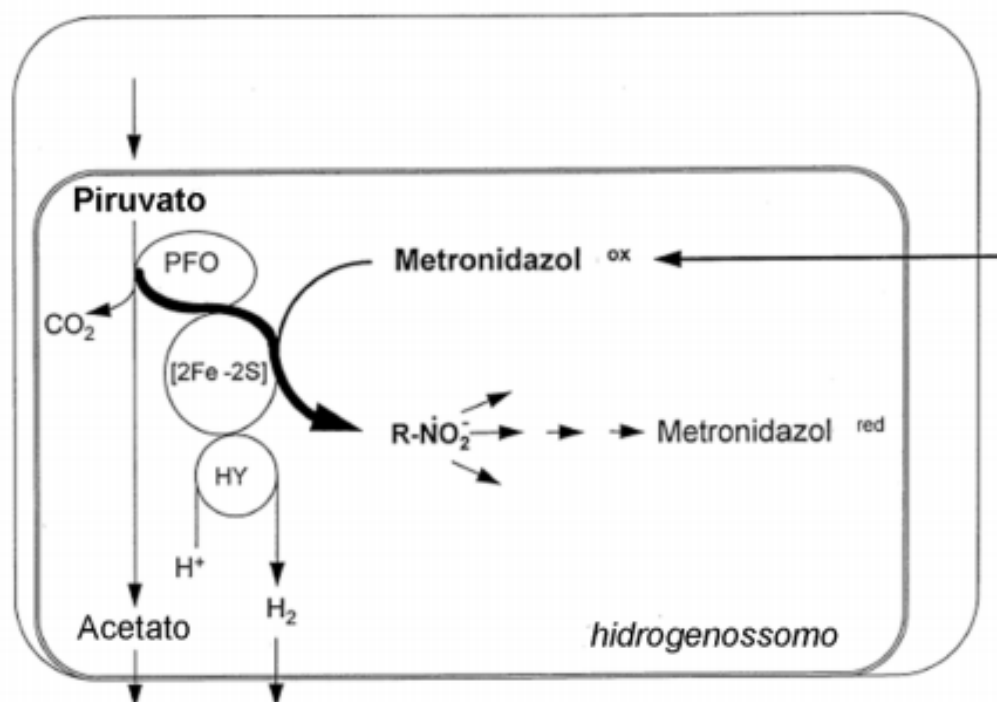


Figura 9. Esquema mostrando a ativação do MTZ no hidrogenossomo através da redução do radical nitro pela enzima PFOR. A ferredoxina é reduzida pela PFOR e transfere elétrons para o MTZ resultando em sua ativação (adaptado de KULDA, 1999).

1.8.1. Resistência ao MTZ

O tratamento atual da tricomoníase é baseado no uso dos 5'-nitroimidazóis. Além da toxicidade do tratamento, algumas cepas tornaram-se resistentes a esses compostos (PAULISH-MILLER *et al.*, 2014; GHOSH *et al.*, 2018; SAITO-NAKANO *et al.*, 2023). A resistência ao metronidazol foi descrita pela primeira vez em 1959 (WATT E JENNISON, 1960) e apresenta uma variação de 4% nos EUA (KIRCALDY *et al.*, 2012) chegando a 17% em Papua Nova Guiné (UPCROFT *et al.*, 2009). Como já relatado anteriormente os medicamentos do grupo dos 5-nitroimidazóis, sendo o metronidazol o mais prescrito, são os únicos aprovados pelo FDA para o tratamento da tricomoníase (DE BRUM *et al.*, 2017; LEITSCH, 2019; SAITO-NAKANO *et al.*, 2023). Devido ao aparecimento de cepas resistentes ao MTZ, doses crescentes e por um maior período são frequentemente administradas, causando mais problemas ao paciente podendo levar à interrupção do tratamento (LEWIS *et al.*, 1997). No entanto, em alguns casos, mesmo altas

doses são ineficazes não deixando possibilidade de tratamento alternativo (SAITO-NAKANO *et al.*, 2023).

Foram propostas vias aeróbicas e anaeróbicas de resistência ao MTZ . A resistência clínica (aeróbica) em *T. vaginalis* não ocorre através do mesmo mecanismo que a induzida em laboratório (anaeróbica) (WRIGHT *et al.*, 2010). A resistência anaeróbica estaria associada à regulação negativa de enzimas hidrogenossomais envolvidas na ativação do metronidazol, como a piruvato-ferredoxina oxidoreductase (PFOR) e a ferredoxina, bem como à redução do tamanho dos hidrogenossomos (WRIGHT *et al.*, 2010; LAND *et al.*, 2001; UPCROFT, 2001). Em contrapartida, cepas de *T. vaginalis* resistentes clinicamente ao metronidazol mostraram que os hidrogenossomos apresentavam tamanhos semelhantes ao de um isolado sensível ao metronidazol (WRIGHT *et al.*, 2010).

A resistência aeróbica, geralmente observada apenas na presença de oxigênio, diminui a toxicidade do MTZ revertendo-o à sua forma inativa através da reoxidação dos ânions nitrorradicais antes do composto causar danos ao parasita (RASOLOSON *et al.*, 2002; TACHEZY *et al.*, 2022). Isolados de *T. vaginalis* clinicamente resistentes apresentam níveis elevados de oxigênio intracelular e têm atividade de eliminação de oxigênio reduzida tornando o MTZ ineficaz (YARLETT *et al.*, 1986; TACHEZY *et al.*, 2022). Embora as vias de resistência aeróbica e anaeróbica sejam distintas, a proteína ferredoxina, que reduz o oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio, parece estar envolvida em ambos processos (LEITSCH *et al.*, 2014). Além disso, a diminuição da atividade da enzima flavina redutase que reduz o oxigênio citosólico estaria relacionada à resistência ao metronidazol em *T. vaginalis* (LEITSCH *et al.*, 2014; TACHEZY *et al.*, 2022).

Como relatado, a resistência de *T. vaginalis* aos medicamentos está aumentando (DE BRUM *et al.*, 2017). Portanto, devido à alta toxicidade e resistência do MTZ, a busca de um novo fármaco alternativo para o tratamento da tricomoníase humana se faz necessário.

Vários compostos foram testados contra protozoários parasitas, entre eles, a miltefosina (ROCHA *et al.*, 2014), metil jasmonato (VILELA *et al.*, 2010), inibidores de $\Delta(24(25))$ -esterol metil transferase, 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxiquinuclidina (BPQ OH) (ROCHA *et al.*, 2014), lactacistina (PEREIRA-

NEVES, *et al.*, 2015), complexos de zinco-clotrimazol (MIDDLEJ *et al.*, 2019), amiodarona, amioder, dronedarona (DE SOUZA *et al.*, 2022), tiosemicarbazonas 49, 51 e 63 (IBÁÑEZ-ESCRIBANO *et al.*, 2022) entre outros. Os autores observaram efeitos na curva de crescimento e nas organelas celulares do parasitas (revisado por BENCHIMOL *et al.*, 2022). Além dos nitroimidazóis, outros artigos descreveram compostos promissores à base de plantas com atividade anti-tricomonal *in vitro* e *in vivo* (HASHEMI *et al.*, 2021). O composto SQ109, que completou a Fase IIb/III para o tratamento da tuberculose, também foi testado contra *T. vaginalis* na presente tese e seus resultados já publicados (DE SOUZA *et al.*, 2023). Outros estudos forneceram uma visão geral das opções de tratamento sistêmico e tópico clinicamente avaliados para tricomoníase humana. Além disso, o atual conhecimento sobre compostos fitoterápicos, semissintéticos e sintéticos avaliados quanto à eficácia como anti-*Trichomonas* foram apresentados (KÜNG *et al.*, 2019).

1.9. Novos compostos alternativos ao metronidazol

Nossa proposta é utilizar, no presente estudo, três grupos de compostos, que são, **(1)** a amiodarona e seus derivados, como a dronedarona e amioder; **(2)** SQ109 [N-adamantan-2-yl-N'-((E)-3,7-dimethyl-octa-2,6-dienyl) -ethane-1,2-diamine], um medicamento em desenvolvimento para tratamento da tuberculose e **(3)** análogos de alquilfosfolipídios (APs).

1.9.1. Amiodarona, dronedarona e amioder

A amiodarona é um medicamento antiarrítmico aprovado nos EUA em 1985, usado para tratar cardiomiopatias (OATES *et al.*, 1987). Além disso, este agente e seus derivados apresentam efeitos antiparasitários (BENAIM *et al.*, 2006). A amiodarona e a dronedarona são benzofuranos lipofílicos catiônicos usados no tratamento de arritmias cardíacas. Estudos anteriores mostraram atividade contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, e *Leishmania mexicana* (SERRANO MARTÍN *et al.*, 2009a). Foi

reportado que esses compostos atuam perturbando a homeostase do cálcio (Ca^{2+}) intracelular desses parasitas (ADESSE *et al.*, 2011; BENAİM *et al.*, 2006; VEIGA-SANTOS *et al.*, 2012) resultando em um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} (BENAİM *et al.*, 2020). A amiodarona também interfere na biossíntese do ergosterol nestes parasitas (BENAİM *et al.*, 2006; SERRANO-MARTÍN *et al.*, 2009b; BENAİM *et al.*, 2020). Tendo em vista que a amiodarona também exibiu atividade contra *L. mexicana*, estudos prévios demonstraram que a dronedarona também poderia ser ativa contra esse organismo. Isso seria de interesse terapêutico já que a dronedarona provoca menos efeitos colaterais em humanos do que a amiodarona (BENAİM *et al.*, 2014). Estudos realizados com a dronedarona mostraram que este composto é capaz de inibir efetivamente o crescimento de promastigotas de *L. mexicana* em cultura e, mais importante, tem excelente atividade contra amastigotas dentro de macrófagos infectados (forma clinicamente relevante), sem afetar a célula hospedeira. Esse composto também foi capaz de inibir a oxidoesqualeno ciclase, uma enzima-chave na biossíntese do ergosterol, conhecida por ser vital para a sobrevivência do parasita (BENAİM *et al.*, 2014).

Amioder é um derivado do benzofurano, baseado na estrutura da amiodarona (HEJCHMAN *et al.*, 2012). Estudos indicaram um efeito significativo sobre o *T. cruzi* (PINTO MARTINEZ *et al.*, 2018). Pesquisas relataram um efeito importante de amioder sobre *Leishmania donovani*, mostrando que inibe o crescimento de promastigotas e de amastigotas presentes dentro de macrófagos. Importante ressaltar que esse composto é mais potente em *Leishmania* do que em *T. cruzi* (MARTINEZ-SOTILLO *et al.*, 2019). Também foi demonstrado que esse composto perturbou a homeostase do Ca^{2+} intracelular em *L. donovani*. O amioder foi capaz de colapsar o potencial de membrana da mitocôndria e, simultaneamente, induzir a alcalinização do acidocalcisomos de *L. donovani*, levando à morte do parasita (MARTINEZ-SOTILLO *et al.*, 2019).

1.9.2. SQ109

SQ109 é um candidato a medicamento antituberculose, tendo já concluído a Fase IIb/III clínica (BAEK *et al.*, 2022). SQ109 apresentou atividade

1221 *in vitro* contra o parasita *T. cruzi* (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2015). Esse composto
1222 inibiu a proliferação de amastigotas intracelulares bem como as formas
1223 epimastigotas. Além disso, o SQ109 provocou grandes alterações estruturais
1224 nas três formas do ciclo de vida desse parasita (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2015;
1225 BENAİM *et al.*, 2020). SQ109 também foi capaz de inibir o crescimento da
1226 forma amastigota de *L. mexicana* com um bom índice de seletividade. Também
1227 foi ativo contra promastigotas onde perturbou a homeostase do Ca^{2+} (GARCÍA
1228 *et al.*, 2016). SQ109 também se mostrou eficaz na inibição da proliferação de *L.*
1229 *donovani*, parasita responsável pela leishmaniose visceral, exibindo um efeito
1230 tóxico sobre as formas amastigotas. Além disso, foi demonstrado pela primeira
1231 vez que o composto SQ109, além de levar ao colapso do parasita, induziu um
1232 dano muito rápido nos acidocalcissomos (GIL *et al.*, 2020), organelas
1233 essenciais para o parasita e envolvidas em muitas funções importantes,
1234 incluindo a homeostase de Ca^{2+} . Ambos os efeitos da droga nessas organelas
1235 geraram um aumento significativo na concentração de Ca^{2+} intracelular,
1236 causando a morte do parasita (Gil *et al.*, 2020).

1237 1238 **1.9.3. Análogos de alquilfosfolipídios (APL)**

1239
1240 Um importante alvo é a biossíntese de fosfolipídios, dado o importante
1241 papel desempenhado por essas moléculas na estrutura e funções no
1242 metabolismo celular (DE SOUZA *et al.*, 2018). Os APL integram uma classe de
1243 compostos farmacêuticos que demonstram excelente biocompatibilidade e
1244 anfifilicidade, tornando-os adequados para uso como medicamentos com
1245 ampla atividade biológica. Os análogos de alquilfosfolipídios foram inicialmente
1246 desenvolvidos como agentes antitumorais. Apresentam estruturas anfifílicas
1247 semelhantes às dos fosfolipídios naturais e são incorporados preferencialmente
1248 nas membranas das células tumorais (GAJATE E MOLLINEDO, 2002).
1249 Posteriormente foram testados e apresentaram atividades antiparasitárias,
1250 induzindo a morte celular por meio de apoptose e/ou autofagia nesses
1251 parasitas (DE SOUZA *et al.*, 2018). Inclusive, a miltefosina que é uma
1252 alquilfosfocolina, foi introduzida na clínica para tratar a leishmaniose visceral,
1253 tendo sido, pela primeira vez, aprovada para este uso na Índia (JHA *et al.*
1254 1999). Os APL podem ser de origem natural ou sintética (VAN HOOGEVEST e

WENDEL, 2014) e subdivididos em duas classes: alquilglicerofosfocolinas, provenientes da edelfosina (ET-18-OCH₃), e alquilfosfocolinas, oriundas da miltefosina (hexadecilfosfocolina). As duas classes estão relacionadas com a inibição da síntese de fosfatidilcolina (URBINA, 2006). Os APL não têm como alvo a molécula de DNA, diferentemente da maioria dos compostos utilizados atualmente. Estão relacionados com processos que envolvem a síntese e organização de membranas celulares, se acumulando e interferindo em importantes vias de sinalização do metabolismo lipídico. Provoca efeitos nos sistemas de transporte celular, na indução de apoptose e na interferência de diversas enzimas-chave, a maioria das quais, envolvidas com o metabolismo lipídico ou mecanismos de sinalização (DE SOUZA *et al.*, 2018). Nas últimas décadas houve um aumento pela procura de fosfolípidos sintéticos, principalmente para o desenvolvimento de medicamentos. Consequentemente, novas rotas sintéticas foram desenvolvidas para produzir fosfolípidos e testadas durante muitos anos. Um exemplo disso é a lisofosfatidilcolina, que foi sintetizada no final de 1960, cujo objetivo principal foi identificar potenciais compostos imunomoduladores (DE SOUZA *et al.*, 2018). No presente estudo os análogos de alquilfosfolípidos foram testados em *T. vaginalis*.

2. Justificativa

O metronidazol constitui a terapia utilizada atualmente para o tratamento da tricomoníase. Embora relativamente eficaz, provoca muitas reações adversas, não sendo recomendado durante a gravidez. O MTZ possui elevado potencial cancerígeno e mutagênico e pode induzir a seleção de cepas resistentes. O estudo de terapias mais eficientes e seguras para o paciente são de extrema importância. Em estudos anteriores os derivados de amiodarona, os análogos de fosfolipídios e o composto SQ109 apresentaram atividades biológicas relevantes em outros protozoários. Desse modo, nos propusemos a testar estes compostos em *T. vaginalis*. O projeto visa avaliar o efeito de compostos que possam agir contra *T. vaginalis* investigando seus efeitos e a possibilidade de uso como medicamento alternativo futuro em substituição ao metronidazol no tratamento da tricomoníase.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Buscar um novo composto para o tratamento da tricomoníase.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar o efeito antiproliferativo e citotóxico dos derivados de amiodarona, análogos de fosfolípidos e SQ109 em *T. vaginalis*.
- Comparar os efeitos dos referidos compostos com o metronidazol.
- Avaliar se ocorre efeito citotóxico dos compostos sobre células de mamíferos,
- Avaliar as alterações morfológicas e ultraestruturais de *T. vaginalis* após o tratamento com os compostos por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.
- Analisar os possíveis mecanismos de morte celular do parasito após os tratamentos utilizando marcadores específicos em microscopia de fluorescência.
- Diferenciar entre os compostos estudados, quais os mais efetivos e promissores para testes posteriores em animais e possível uso futuro em pesquisa aplicada.

4. Metodologia

4.1. Cultivo *in vitro* de *T. vaginalis*

T. vaginalis da cepa JT, isolada no Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foi cultivada em meio TYM (DIAMOND, 1957) com 10% de soro fetal bovino inativado a 37° C por 24 h, correspondendo a fase logarítmica de crescimento celular. O meio TYM tem como componentes a triptona, extrato de levedura, maltose, *L*-cisteína, ácido ascórbico, fosfato de potássio monobásico e dibásico, pH 6,2 (Tabela 3).

Tabela 3. Componentes do meio TYM, utilizado no cultivo de *T. vaginalis*. Os componentes abaixo citados foram dissolvidos em água Milli-q para um total de 450 mL, pH 6,2.

Meio TYM		
Triptone	10g	Sigma, St. Louis, Estados Unidos
Extrato de levedura	5g	BD, Le Pont de Claix, França
Maltose	2,5g	Vetec, Duque de Caxias, Brasil
Cisteína	0,5g	Sigma, St. Louis, Estados Unidos
Ácido ascórbico	0,1g	Sigma, St. Louis, Estados Unidos
Fosfato de potássio monobásico	0,4g	Vetec, Duque de Caxias, Brasil
Fosfato de potássio dibásico	0,4g	Vetec, Duque de Caxias, Brasil

4.2 Compostos

Todos os compostos utilizados neste estudo foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) na concentração estoque de 5 ou 10 mM e mantidos a - 20° C. As concentrações finais utilizadas nos ensaios abaixo descritos foram de 1, 5, 10 e 20 µM.

1343 **4.2.1 Amiodarona, dronedarona e amioder**

1344
1345 A figura 10 a-c mostra a estrutura da amiodarona, dronedarona e
1346 amioder, respectivamente. A amiodarona foi adquirida na Sigma, St. Louis, MO,
1347 EUA. Dronedarona foi extraída e cristalizada de comprimidos comerciais
1348 (Multaq) (Benaim *et al.* 2012). O composto amioder (7-acetil-5-Bromo-6-hidroxi-
1349 3-bromometil-2-benzofurancarboxilato de metila) foi gentilmente cedido pelo Dr.
1350 Elżbieta Hejchman, do Departamento de Química orgânica (Faculdade de
1351 Farmácia, Universidade Médica de Varsóvia).

1352 **4.2.2 SQ109**

1353
1354
1355 A figura 10-d mostra a estrutura química de SQ109 [N-adamantan-2-il-
1356 N'-((E)-3,7-dimetil-octa-2,6-dienil) -etano-1,2 diamina]. Este composto foi
1357 gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Antonios Kolocouris do Departamento de
1358 Farmácia da Universidade de Atenas, Grécia, e pelo Prof. Eric Oldfield do
1359 Departamento de Química da Universidade de Illinois em Urbana-Champaign,
1360 EUA).

1361 **4.2.3 Análogos de alquilfosfolipídios (APL)**

1362
1363
1364 A figura 10 e-f mostra a estrutura química dos APL LDT117 e LDT134.
1365 Os análogos de fosfolipídios foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo
1366 grupo do Dr. Luiz Romeiro (Núcleo de Medicina Tropical - Campus Universitário
1367 Darcy Ribeiro - Universidade de Brasília-UnB).

4.2.4 Tabela 4. Compostos utilizados e sua origem

Compostos	Concentração utilizada	Origem
Amiodarona	1,5, 10 e 20 µM	(Sigma, St. Louis, MO, EUA)
Amioder	1,5, 10 e 20 µM	Dr. Elżbieta Hejchman Departamento de Química orgânica - Faculdade de Farmácia, Universidade Médica de Varsóvia
Dronedarona	1,5, 10 e 20 µM	Dr. Gustavo Benaim Instituto de Biologia Experimental, Facultad de Ciencias, Universidade Central da Venezuela, Caracas, Venezuela
SQ109	1,5, 10 e 20 µM	Dr. Antonios Kolocouris Departamento de Farmácia da Universidade de Atenas, Grécia Dr. Eric Oldfield Departamento de Química da Universidade de Illinois em Urbana- Champaign, EUA
LDT117	1,5, 10 e 20 µM	Dr. Luiz Romeiro Núcleo de Medicina Tropical – Campus Universitário Darcy Ribeiro - Universidade de Brasília- UnB
LDT134	1,5, 10 e 20 µM	Dr. Luiz Romeiro Núcleo de Medicina Tropical – Campus Universitário Darcy Ribeiro - Universidade de Brasília- UnB

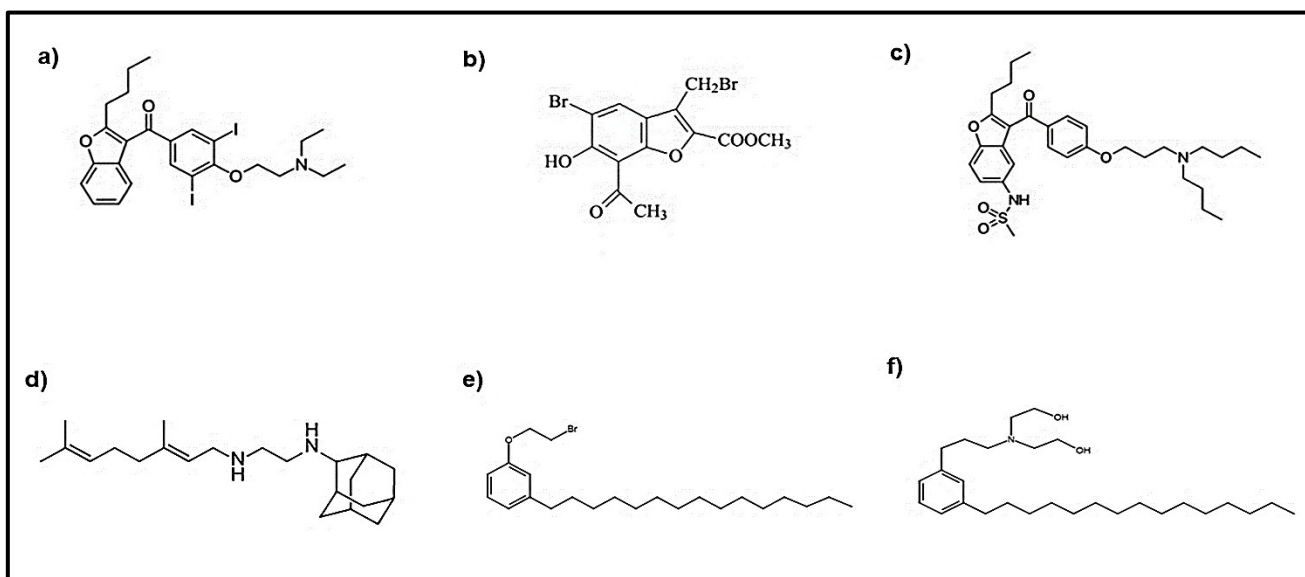


Figura 10. Estrutura molecular amiodarona (a), amioder (b), dronedarona (c), SQ109 (d), LDT117 (e) e LDT134 (f).

4.3. Curva de crescimento

Os trofozoítos (10^5 céls/mL) foram cultivados em tubos *ependorfs* de 5 mL contendo meio TYM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os compostos foram adicionados às culturas nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 μ M. É importante ressaltar que nenhuma concentração de DMSO foi superior a 1%. O metronidazol foi utilizado como controle positivo na concentração de 2 e 10 μ M (Rocha *et al.*, 2014). As culturas-controle e as tratadas foram mantidas em estufa úmida a 37°C por 24, 48 e 72 h. Após esses intervalos de tempo, o número total de células foi contado em câmara de *Neubauer* ou por citometria de fluxo. As curvas de crescimento do parasito foram elaboradas a partir da seguinte fórmula: $(A \div 4) \times B \times C$ onde **A** = N° de células contadas e somadas nos quatro quadrantes da Câmara de Neubauer; **B** = 10^4 (Fator da Câmara de Neubauer); **C** = Fator de diluição utilizada ou não. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os resultados foram analisados com o programa analítico *GraphPad Prism 9.0®* (EUA).

4.3.1 Cálculo de IC₅₀

Para determinar a concentração do composto que inibiu o crescimento do parasita em 50% (IC₅₀), a porcentagem de inibição do crescimento foi plotada em função da concentração da droga, e os valores foram ajustados em uma curva não linear. As análises de regressão foram realizadas utilizando o *Sigma Plot* 8.0. Os dados foram plotados usando o *GraphPad Prism* 9.0® (EUA).

$$I = I_{\max} \times \frac{C}{IC_{50} + C}$$

Onde *I* corresponde a porcentagem (%) de inibição, *I*_{max}^x = 100% de inibição, *C* a concentração de inibição e IC₅₀ à concentração responsável por inibir 50% do crescimento.

4.4. Ensaio de viabilidade

4.4.1 Ensaio de viabilidade com diacetato de fluoresceína e 7-AAD

A viabilidade das células foi avaliada usando diacetato de fluoresceína (FAD) (Sigma, EUA) e 7-aminoactinomicina (7-AAD) (Sigma, EUA). O diacetato de fluoresceína (FAD) reage com o óxido nítrico (NO) e forma um benzotriazol fluorescente. Essa fluorescência (verde) é um indicador de células viáveis, pois esse reagente só tem a capacidade de permear a membrana plasmática das células que estão vivas. Já o 7-AAD, possui alta afinidade pelo DNA, mas só consegue permear a membrana de células inviáveis, se tornando assim um o indicador de células mortas ou com a viabilidade comprometida. Parasitas controle e tratados com SQ109 na concentração de 10 µM por 48 h foram incubados com 10 µg/mL de FDA e 0,25 µg/mL de 7-AAD a 37°C por 5 min para análise por microscopia de fluorescência. Células viáveis foram vistas na

cor verde com FDA, enquanto as células mortas apresentaram fluorescência com uma cor laranja com 7-AAD. As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio de fluorescência (Axiphot II –Zeiss, Alemanha).

4.4.2. Ensaio de viabilidade com MTS/PSM

Para avaliação dos efeitos dos compostos em relação à toxicidade nas células de mamífero foi utilizado o ensaio de redução do sal tetrazólio MTS/PMS (Promega, *Technical Bulletin*, EUA). O MTS é análogo ao MTT, sendo um sal tetrazólio de segunda geração. Ao ser adicionado no meio de cultura com as células metabolicamente viáveis, o MTS necessita de um segundo reagente, o PMS (5-metil- fenazínio metil sulfato) que através de cofatores, como NADH e NADPH, serão reduzidos, transferindo elétrons ao sal tetrazólio (MTS) produzindo o formazan. Quando o formazan é reduzido na célula, seja enzimaticamente, seja por reação direta com NADH ou NADPH, o sal de tetrazólio, MTS, muda de cor e forma um precipitado solúvel. Desse modo, o corante formazan produzido pode ser quantificado medindo a absorbância a 490-500 nm. A quantidade de MTS, marcador da viabilidade celular incorporada pela população de células, é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura (Cory *et al.*, 1991). Para realização do ensaio, 100 µl de solução salina tamponada com fosfato (PBS) suplementado com 10 mM de glicose foi adicionado em cada poço. Em seguida, foi preparada a solução de PMS/MTS (50 µl da solução estoque do PMS em 1 mL da solução estoque do MTS) adicionando 20 µl dessa solução em cada poço (concentração final de MTS a 40 µg (333 µg/mL) e PMS a 0,92 µg (25 µM) por poço). O ensaio foi incubado a 37°C por 4 horas na ausência de luz. Em seguida, foi realizada a leitura no leitor de placas a 490 nm (*Molecular Devices Microplate Reader ou Spectra Max Molecular Devices M2*, EUA) onde o comprimento de onda emitido pelo substrato das células foi avaliado. Os dados foram expressos em absorbância e foram plotados usando o *GraphPad Prism 9.0®* (EUA).

4.5. Análise da toxicidade em células de mamíferos

As células epiteliais de rim de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), LLC-MK2 (ATCC CCL7 Rockville, MD/EUA) foram cultivadas em placas de 96 poços (2×10^4 céls/mL), em meio RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C, em um volume final de 200 µL por poço. Os compostos LDT's (análogos de fosfolipídios) foram adicionados 24 h após o plaqueamento das células LLCMK2, nas concentrações de 5, 10, 50 e 100 µM. As culturas foram mantidas por mais 48 h a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂, contabilizando 72 h totais de plaqueamento das células e 48 h de incubação com os compostos. Em seguida, todo o meio RPMI foi retirado e as células foram lavadas com PBS suplementado com 10 mM de glicose, pH 7.2 e os poços foram preenchidos com 100 µL dessa mesma solução. O controle negativo foi realizado utilizando três poços de células não tratadas fixadas com 4% de formaldeído nascente, a partir do paraformaldeído (Vetec, Brasil). Para avaliação da citotoxicidade foi utilizado o teste de viabilidade celular MTS/PMS (*Promega, Technical Bulletin*, EUA) como descrito acima no item 4.5.2.

4.6. Microscopia de fluorescência

As células foram lavadas em PBS (morno) pH 7.4 e fixadas em formaldeído a 4% (Merck, Alemanha) em tampão fosfato pH 7.2 por 5 min e colocadas em lamínulas previamente revestidas com poli-L-lisina, por 10 min. Em seguida, foram lavadas com PBS pH 7.4 e foram incubadas por 5 min com 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Molecular Probes, EUA) diluído a 1:5000 em PBS. As lamínulas foram lavadas e montadas com *Prolong Gold Antifade Mountant* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e observadas em microscópio de fluorescência (Axiphot II ou Elyra PS.1 Zeiss, Alemanha). As imagens foram adquiridas usando um C5985- 10 câmeras CCD em tempo real (Hamamatsu, Japão) ou Elyra PS.1 (objetiva 100×e laser 405 nm). No mínimo 200 células foram analisadas.

4.6.1 Imunofluorescência

Parasitas controle e tratados foram lavados com PBS morno (pH 7,2) e aderidos em lamínulas previamente revestidas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, EUA), por 10 min a 37°C. As células foram fixadas por 1 h com formaldeído a 4%, em seguida, as células foram lavadas em PBS pH 7.4 e permeabilizadas com Nonidet NP-40 3% diluído em PBS por 40 min (Sigma, St. Louis, USA) e incubadas com tampão de bloqueio contendo NH₄Cl 50 mM e 3% de albumina de soro bovino (PBS/BSA; Sigma-Aldrich, Brasil), pH 8.0, por 1 h. Após esta etapa, as amostras foram lavadas com PBS (pH 8,0) e incubadas na presença do anticorpo primário policlonal anti-acetil-alfa tubulina (Thermo Fisher; EUA) na diluição de 1:1000 em PBS/BSA. Após a incubação, as amostras foram lavadas com PBS/BSA (pH 8,0) e incubadas durante 1 h com o anticorpo secundário Alexa Fluor 647 Anticorpo IgG anti-mouse (LifeTechnologies, EUA), diluídos em 1:100 em PBS/BSA. Em seguida, as amostras foram lavadas 3 vezes e incubadas com o marcador nuclear Hoechst (Molecular Probes, EUA), diluído em 1:2000 em PBS, por 30 min. Por fim, as lamínulas foram lavadas, montadas com *Prolong Gold Antifade Mountant* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e observadas em microscópio de fluorescência (Axiphot II e Elyra Zeiss, Alemanha).

4.6.2. TUNEL

Para analisar se houve fragmentação do DNA o método do TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP Nick-end labeling*) foi utilizado usando o teste “*In Situ Cell Death Detection Kit*” (Roche Diagnostics, Meylan, França). Os parasitos foram incubados com os compostos por 12 h e 24 h, fixados à temperatura ambiente em formaldeído a 2% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) e, posteriormente, lavados em PBS. Logo após, as células foram permeabilizadas com 3% de Nonidet-40 (Sigma, St. Louis, USA) por 40 minutos. Em seguida, as amostras foram embebidas em cloreto de amônio 50 mM e 3% de albumina bovina (BSA) em PBS por 30 minutos. A marcação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Controles positivos foram tratados com DNase I (Sigma, St. Louis, MO, EUA) por 10 minutos à temperatura ambiente, enquanto os controles negativos foram marcados com o fluorocromo que não possui o terminal da enzima transferase. As amostras

foram observadas em um microscópio de fluorescência (Axiphot II – Zeiss, Alemanha). As imagens foram adquiridas usando uma câmera CCD em tempo real C5985- 10 (Hamamatsu, Japão).

4.6.3. Potencial de membrana hidrogenossomal

Parasitas controle e tratados com SQ109 foram incubados com 5 µg/mL do reagente JC-1 (Invitrogen, EUA) a 37°C por 15 min, um marcador que fluoresce em verde ou vermelho de acordo com o potencial de membrana de organelas como mitocôndrias e hidrogenossomos. O marcador JC-1 ao entrar seletivamente em uma dessas organelas de acordo com a magnitude do potencial de sua membrana, altera seu estado oligomérico, e fica fluorescente. A razão da intensidade de fluorescência vermelha: verde do JC-1 depende do potencial de membrana hidrogenossomal (Vilela *et al.*, 2010). O CCCP (cianeto de carbonila3-clorofenilhidrazona), um desregulador do potencial de membrana mitocondrial, foi usado como controle positivo para confirmar a resposta do JC-1. Uma alíquota de 1 µL de uma solução CCCP 50 mM foi adicionada às células a 37°C por 5 min em um volume final de 1 mL. As lamínulas foram montadas e as imagens foram adquiridas utilizando um microscópio de fluorescência (Axiphot II – Zeiss, Alemanha).

4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para avaliar a morfologia dos trofozoítos, antes e depois do tratamento com os compostos, *T. vaginalis* (10⁵ céls/mL) foram cultivadas em microtubos *eppendorfs* de 5 mL contendo meio TYM suplementado com 10% SFB. Os compostos foram adicionados às culturas nos tempos de 12h ou 24h de cultivo dos parasitos nas concentrações de 1 µM, 5 µM, e 10µM. Após 24h ou 48h da adição dos compostos os microtubos com os parasitas-controle e tratados foram vigorosamente agitados e, em seguida, centrifugados (Centrífuga *Eppendorf*, Alemanha, rotor: 5427) por 5 min a 150 x g. As células foram aderidas em lamínulas revestidas com poli-L-lisina 0,1% (Sigma, EUA) por 15 min e fixadas por 2 h em uma solução contendo glutaraldeído (*Electron*

Microscopy Sciences, EUA) 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2. Em seguida, as amostras foram lavadas em PBS pH 7,2 e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1 M por 1h, na ausência de luz. Após esse procedimento, as amostras foram lavadas em PBS pH 7,2 por 3 vezes e desidratadas em soluções progressivas de etanol (*Merck*, Alemanha) (15%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% e super-seca por duas vezes) por 15 min cada série. Posteriormente, foram secas pelo método de ponto crítico (*Baltec* CPD 030, Alemanha) ou (*Leica* CPD 300, Alemanha), utilizando CO₂ líquido. Em seguida, foram montadas em suportes metálicos para MEV (*stubs*) e recobertas com ouro (10 nm) ou 4 nm de platina em metalizador FL-9496 (*Balzers Union*, Suíça). O material foi observado no microscópio eletrônico de varredura Quanta 250 (FEI Company, The Netherlands) operando em 20 kV ou Auriga 40 (Zeiss, Alemanha), operando em 2 kV.

4.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para avaliar possíveis alterações ultraestruturais, as culturas-controle e tratadas (10⁵ céls/mL) foram cultivadas em microtubos *ependorfs* de 5 mL contendo meio TYM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os compostos foram adicionados às culturas nos tempos de 12 h ou 24 h nas concentrações de 1 µM, 5 µM e 10 µM. Após 24 h ou 48 h de adição dos compostos, as culturas foram lavadas em PBS, pH 7.2 e, posteriormente, fixadas por 2 horas em uma solução contendo glutaraldeído (*Electron Microscopy 1249 Sciences*, EUA) 2.5%, em tampão cacodilato 0,1M, pH 7.2. Logo após, foram centrifugadas a 1.000 g, por 5 min, todo o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas em PBS novamente e pós-fixadas em solução contendo tetróxido de ósmio 1% contendo ferrocianeto de potássio 0,8%, em tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora, na ausência de luz. Após a pós-fixação, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS pH 7.2 e desidratadas em soluções progressivas de acetona (*Merck*, Alemanha) (50%, 70%, 90%, 100% e realizadas 3 trocas com acetona super-seca), deixando as amostras por 15 min em cada etapa. Em seguida, as células foram infiltradas em resina epóxi (*PolyBed 812*, *Electron 1258 Microscopy Sciences*, EUA). A infiltração foi feita gradualmente em 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 polimerizado na estufa a 60°C, por 72 h. Depois de polimerizados, os blocos foram trimados e seccionados com uma faca de diamante (Drukker, Holanda, ou Diatome, Suíça) no ultramicrotomo Leica (Alemanha) ULTRACUT UCT7. Cortes ultrafinos de 70 nm foram coletados em grades de cobre de 300 *mesh* e contrastados com acetato de uranila 5% por 40 minutos e em citrato de chumbo por 5 minutos e visualizados ao microscópio eletrônico de transmissão Hitachi HT 7800 (Japão).

4.9. Morfometria

Para análises morfométricas imagens de cortes ultrafinos de 20 células aleatórias foram adquiridas com o mesmo aumento observadas no microscópio eletrônico de transmissão Hitachi HT 7800 (Japão). O software ImageJ ([//imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)) foi utilizado para delinear e medir a área de superfície e o volume de toda a célula e de cada hidrogenossomo observado.

4.10. Citoquímica - Método de Thiéry (Thiéry 1967)

Os parasitas foram fixados e processados conforme descrito acima para MET (item 4.9). Posteriormente, cortes dourados (90 nm) foram coletados em grades de ouro e incubados por 20 min em solução de 1% de ácido periódico. Subsequentemente, foram lavados em água destilada e incubados com tiosemicarbazida a 1% em ácido acético 10% por 24 horas. Sucessivas lavagens foram realizadas em ácido acético 10%, 5% e 2% por 10 minutos cada. Em seguida, foram incubados com proteinato de prata 1% por 30 min, protegidos da luz. Posteriormente, lavagens sucessivas em água destilada foram realizadas por 10 minutos cada, e cortes não contrastados foram observados no microscópio eletrônico de transmissão Hitachi HT 7800 (Japão).

4.11. Citometria de Fluxo

4.11.1 Ensaio para avaliação do ciclo celular

A amiodarona foi adicionada às culturas na concentração de 10 μ M e deixada por 24 h. Após a incubação, os parasitas foram coletados, lavados com PBS, pH 7.2 e centrifugados (Centrífuga *Eppendorf*, Alemanha, R: 5427) por 5 min a 238 g. Posteriormente, foram fixados em formaldeído a 0,25% em PBS por 5 min, lavados e ressuspensos em etanol 70% a 4°C por 30 min. Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em 600 μ l de PBS com 25 μ g/mL de PI (iodeto de propídio) e 100 μ g/mL de RNase A e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. A análise foi realizada em um citômetro de fluxo BD Accuri C6 (Becton Dickinson Bioscience BDB, San Jose, CA, EUA) filtro FL2 585/40 nm. Os dados obtidos foram analisados usando o BD Software Accuri C6 (DE SOUZA *et al.*, 2022).

4.12. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o *GraphPad Prism* 9 (EUA). O teste t de *Student* foi usado para cálculos de significância. As fases do ciclo celular, morfometria e estereologia dos hidrogenossomos foram analisadas e os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$ e $\leq 0,01$.

4.13. Previsão de interações moleculares

Para a fase de investigação e predição da interação molecular, estudos de simulação de ancoramento molecular envolvendo a proteína ferredoxina de *T. vaginalis* (TvFd), código PBD: 1L5P 2,20 Å (Crossnoe *et al.*, 2002), e compostos MTZ e SQ109 foram realizados.

4.14. Simulação de ancoramento molecular

Para a etapa de *docking molecular* foi utilizado o programa PYRX v.0.8 que reúne um grande conjunto de outros programas para a realização dos processos de encaixe (AutoDock 4 e AutoDock Vina), geração de arquivos de entrada (AutoDock Tools), linguagem de programação/script (Python), interface gráfica (wxPython) e outras como Open Babel e matplotlib (Dallakyan e Olson,

2015). Inicialmente foi realizado um processo de *redocking*, um ancoramento entre as proteínas TvFd usada como modelo e seu ligante natural, o complexo [2Fe-2S], para identificar as energias das interações e as coordenadas da caixa e tamanho com base em informações de suas interações com o complexo [2Fe-2S] depositado no banco de dados PDB (CROSSNOE *et al.*, 2002). Em seguida, a etapa de ancoramento foi realizada entre a TvFd e os compostos SQ109 e metronidazol, bem como o complexo [2Fe-2S] (ligante natural), sendo o formato SMILES dos compostos convertidos para o formato .pdb, necessário para análises de *docking molecular*, com o auxílio do SMILES tradutor online e gerador de arquivos de estrutura NCI/CADD (<https://cactus.nci.nih.gov/translate/>). A proteína e os compostos (ligantes) foram otimizados pelo servidor gratuito APBS & PDB2PQR (<http://server.poissonboltzmann.org/>) para protonação correta, simulando um ambiente de pH 6,5 (Crossnoe *et al.*, 2002). Na interface PYRX, a *grid box* foi construída para cobrir a região dos resíduos do sítio ativo que interagem com o ligante natural [2Fe-2S] em coordenadas x = 12, y = 50 e z = 2; tamanho 20 × 20 × 20. Além disso, a simulação de docagem foi realizada com uma exaustividade igual a 100, gerando 10 poses para cada composto, incluindo o ligante natural. Os resíduos do sítio ativo alvo que interagem com os ligantes foram identificados pelo programa BIOVIA Discovery Studio 2021 (Jurrus *et al.*, 2018). UCSF Chimera (desenvolvido pelo *Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics* da Universidade da Califórnia, São Francisco, com suporte do NIH P41-GM103311) e PyMOL (*Molecular Graphics System*, versão 2.0 Schodinger, LLC) foi usado para gerar as imagens e arquivos na extensão .pdb.

5. Resultados

5.1. Seleção dos compostos

Realizamos um *screening* inicial com os diferentes grupos de drogas para avaliar inicialmente o potencial anti-parasitário dos compostos que seriam testados posteriormente. Nos resultados preliminares, o crescimento das

culturas de *T. vaginalis* foi analisado após o tratamento com os compostos amiodarona, dronedarona, amioder (amioder D4) e SQ109 na concentração de 10 μ M (Fig. 11), e também após o tratamento com análogos de alquilfosfolídeos (Fig. 25). O metronidazol (MTZ) na concentração de 10 μ M foi utilizado como controle positivo. As células controle (sem tratamento) ou incubadas com o veículo diluidor (DMSO) e aquelas tratadas com os diferentes compostos, foram contadas em períodos variáveis entre 24 h e 72 h. As células foram contadas em câmara de *Neubauer*.

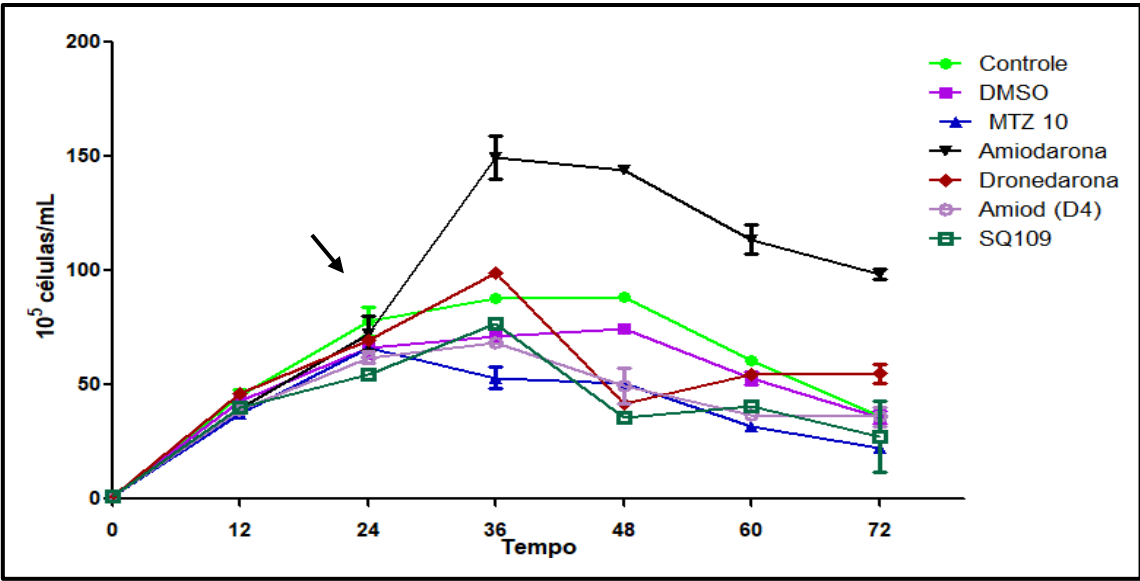


Figura 11. *T. vaginalis* cultivadas na presença de diversos compostos na concentração de 10 μ M. A seta indica o momento de adição dos compostos às culturas. Dados são expressos como média $\pm$ SEM (N=3).

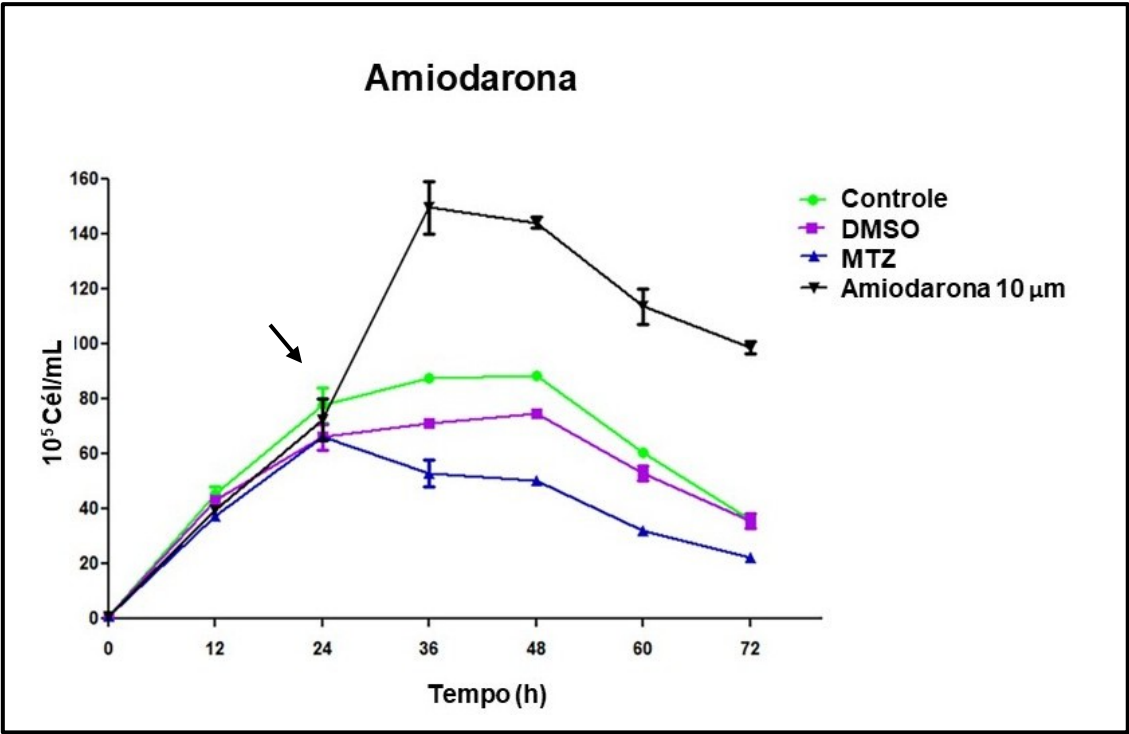
5.2. Efeito da amiodarona, amioder e dronedarona em *T. vaginalis*

5.2.1. Curvas de crescimento

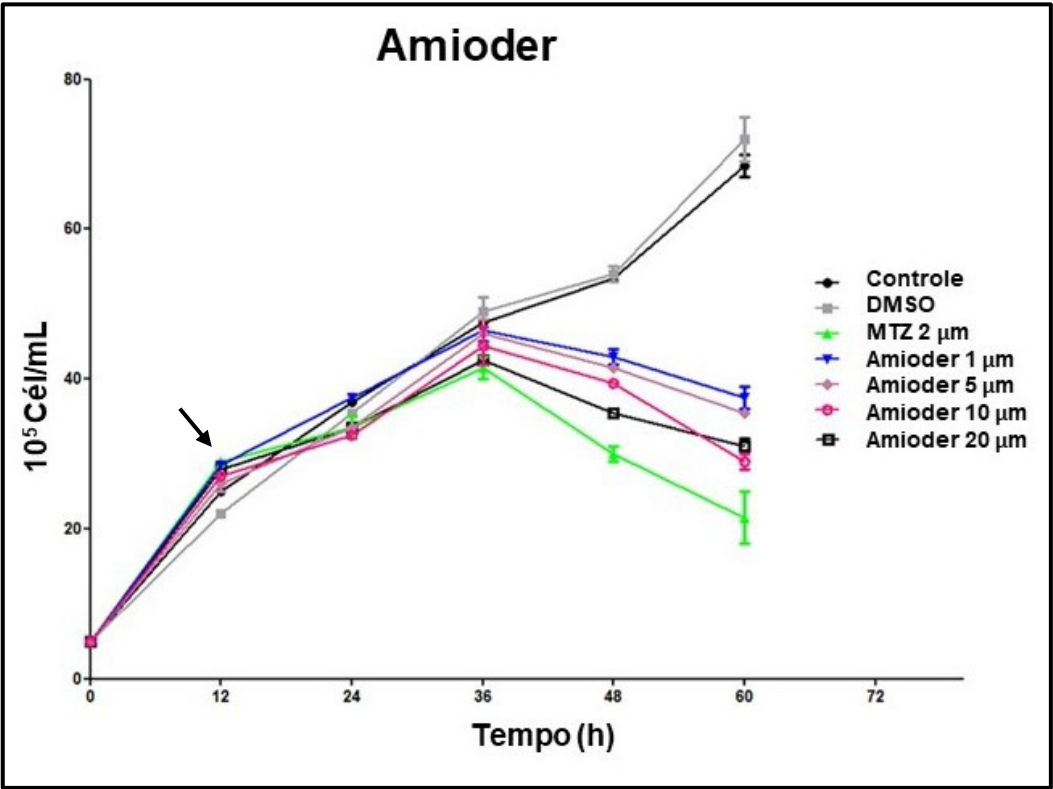
A figura 12 a-c mostra o efeito da amiodarona, amioder e dronedarona no crescimento do parasita. Não observamos inibição do crescimento celular quando amiodarona foi usada (Fig. 12a), mesmo em uma concentração de 10 μ M. Em contrapartida, houve um aumento no número de células. O MTZ a 2 μ M por 48 h, usado como controle positivo, mostrou um efeito inibitório com o

valor de IC_{50} No caso da amioder (Fig. 12b), observamos um efeito inibitório dose dependente com um IC_{50} de 3,5 μ M. Na concentração de 10 μ M, a inibição foi quase a mesma observada com 2 μ M de MTZ. Quando a dronedarona foi usada (Fig. 12c), um alto efeito inibitório também foi observado com um IC_{50} de quando usada a concentração de 11 μ M. É importante ressaltar que o DMSO não afetou o crescimento do parasita na concentração usada para diluir os compostos, reforçando que nenhuma concentração de DMSO foi superior a 1%.

a



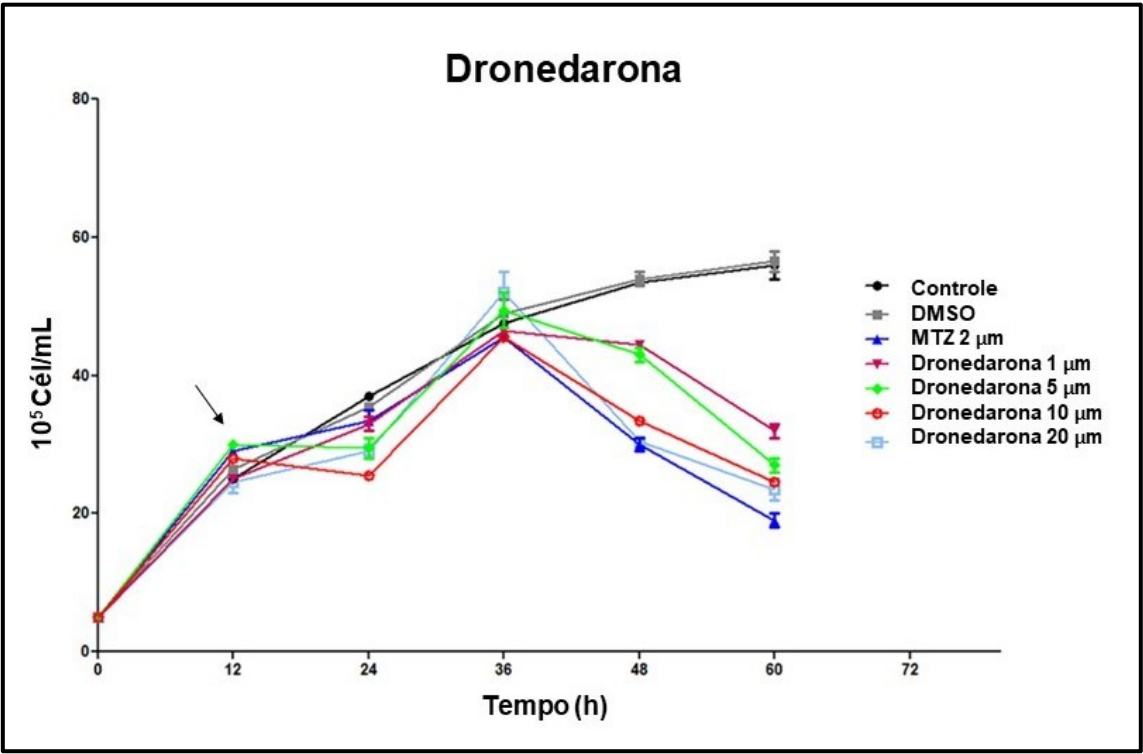
1727 **b**



1728

1729

1730 **c**



1731

Figura 12. (a) *T. vaginalis* controle e tratadas com DMSO 0,1%, 10 µM de amiodarona e 10 µM metronidazol (MTZ). **(b)** *T. vaginalis* controle e tratadas com DMSO 0,1% e 1, 5, 10 e 20 µM de amioder e 2 µM de metronidazol (MTZ). **(c)** *T. vaginalis* controle e tratadas com DMSO 0,1%, e 1, 5, 10 e 20 µM de dronedarona e 2 µM de metronidazol (MTZ). As setas indicam o horário de adição dos compostos (12 ou 24 h). Os dados são expressos como média ± SEM (N=3).

5.3. Observações microscópicas

Foram analisadas imagens de microscopia óptica de contraste de fase (Fig. 13), microscopia de fluorescência (Figs. 14, 17-18), microscopia eletrônica de varredura (Figs. 18-19) e microscopia eletrônica de transmissão (Figs. 21 - 24). Observamos células gigantes provavelmente, resultantes de citocinese interrompida, e a formação de grandes agregados celulares (Figs. 13-14). Com a finalidade de buscar possíveis sinais de morte celular por apoptose, realizamos o teste do TUNEL. Observamos reação positiva de fragmentação do DNA, indicativo de morte celular por apoptose (Figs. 18c' – d'). Por microscopia eletrônica de varredura, confirmamos a presença de agregados celulares e alterações morfológicas dos parasitas sob efeito dos compostos (Figs. 19-20). Por microscopia eletrônica de transmissão, os parasitas exibiram grande agregação de grânulos de glicogênio, principalmente em torno dos hidrogenossomos. Estes se encontraram próximos à periferia da célula e em maior número. Vale ressaltar a presença de grandes vacúolos (Figs. 21-24).

5.4. Microscopia óptica

5.4.1 Contraste de fase

Para verificar as possíveis alterações morfológicas provocadas pelo composto amiodarona, imagens de contraste de fase foram analisadas onde observamos aumento do número de células, como indicado na Fig. 13. As culturas que não foram tratadas (controle) mostraram células livres (Fig. 13a), enquanto as culturas tratadas com amiodarona (Fig. 13b-d) exibiram agregados celulares de tamanhos variáveis após 24 h.

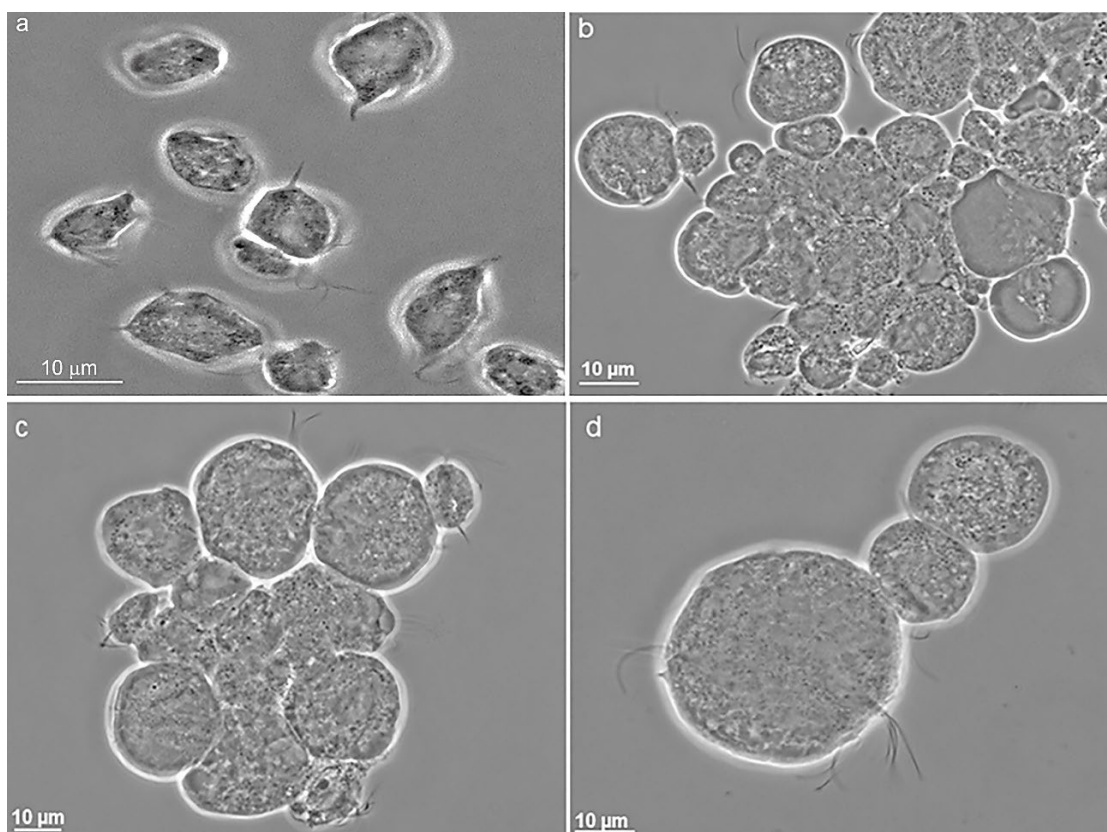


Figura 13. Contraste de fase de *T. vaginalis* controle **(a)**, apresentando morfologia normal. Células tratadas com amiodarona 10 μ M por 24 horas **(b-d)**. Notam-se células arredondadas e agregadas.

5.4.2. Imunofluorescência

A análise por microscopia de fluorescência de células marcadas com DAPI para identificar os núcleos, mostraram um aumento significativo no número de células tratadas exibindo vários núcleos (dois ou mais) quando comparadas às células controle (Fig. 14 a-b). A figura 15 indica o número de células contadas contendo dois ou quatro núcleos. O número de células multinucleadas foi significativamente maior nas células tratadas por 12 ou 24 h com amiodarona. A figura 16 mostra uma análise do ciclo celular do parasita controle e de células tratadas com amiodarona, usando citometria de fluxo. Enquanto a maioria das células controle encontra-se na fase G1, um número maior de células na fase G2 foi observado nas células tratadas. (Fig. 16a-b). Com a marcação de tubulina acetilada, estruturas citoesqueléticas duplicadas de células tratadas com amiodarona (Fig. 17a-b) e células com dois núcleos (Fig. 17c) foram observadas.

O ensaio TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP Nick-end labeling) foi utilizado para verificar se os compostos amioder e donedarona, que inibiram o crescimento celular de *T. vaginalis*, induziam a morte celular por um mecanismo semelhante ao de apoptose. Os controles positivos foram tratados com DNase I, enquanto os controles negativos foram marcados com o kit fluorocromo, que não possui a enzima terminal transferase. A figura 17a mostra células controle, onde nenhuma marcação foi observada. A figura 17b exibe um controle positivo de células tratadas com DNase, onde foi observada marcação positiva. Além disso, *T. vaginalis* tratadas com 10 μ M de amioder (Fig. 18c) ou dronedarona (Fig. 18d) por 24 h também apresentaram marcação, indicando a indução de morte por um mecanismo semelhante à apoptose.

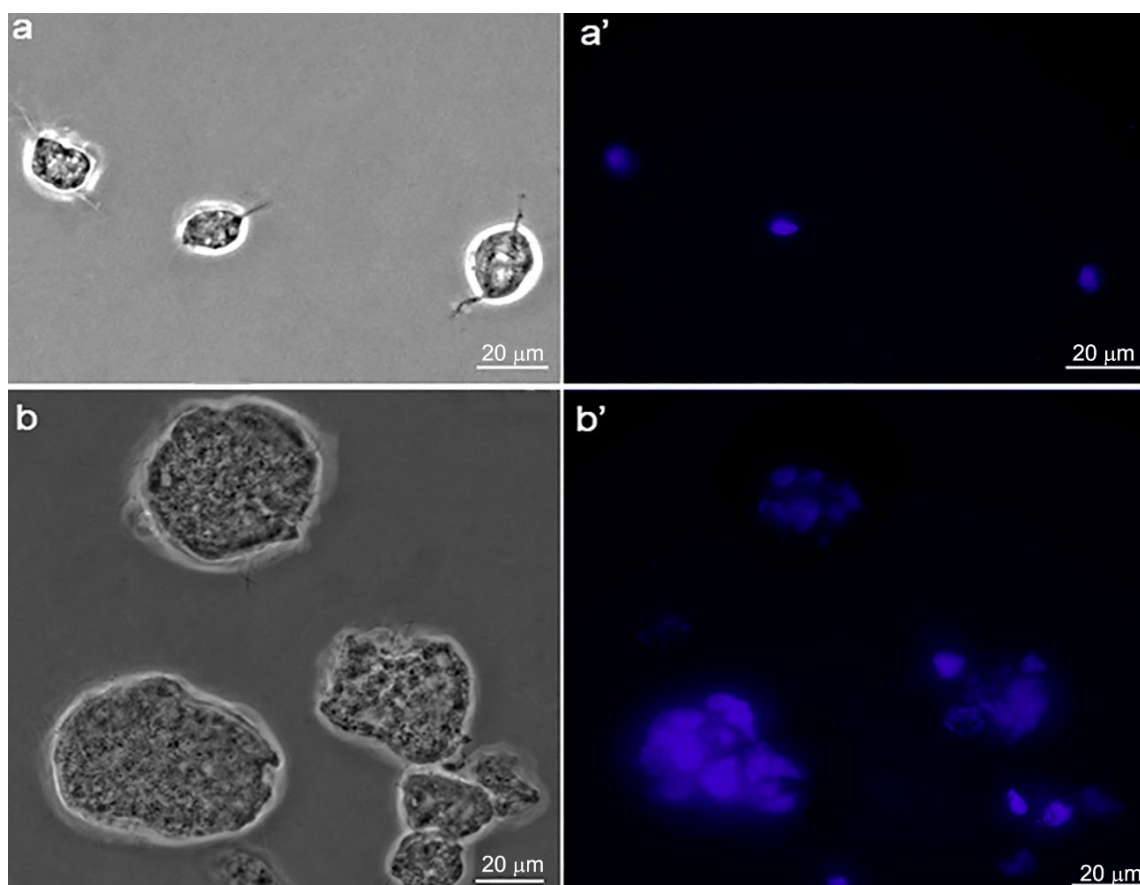


Figura 14. Microscopia de Fluorescência de *T. vaginalis*. Controle (a) e após 24 horas de tratamento com 10 μ M de amiodarona (b). Nota-se que células controle são piriformes enquanto as tratadas são muito maiores e multinucleadas.

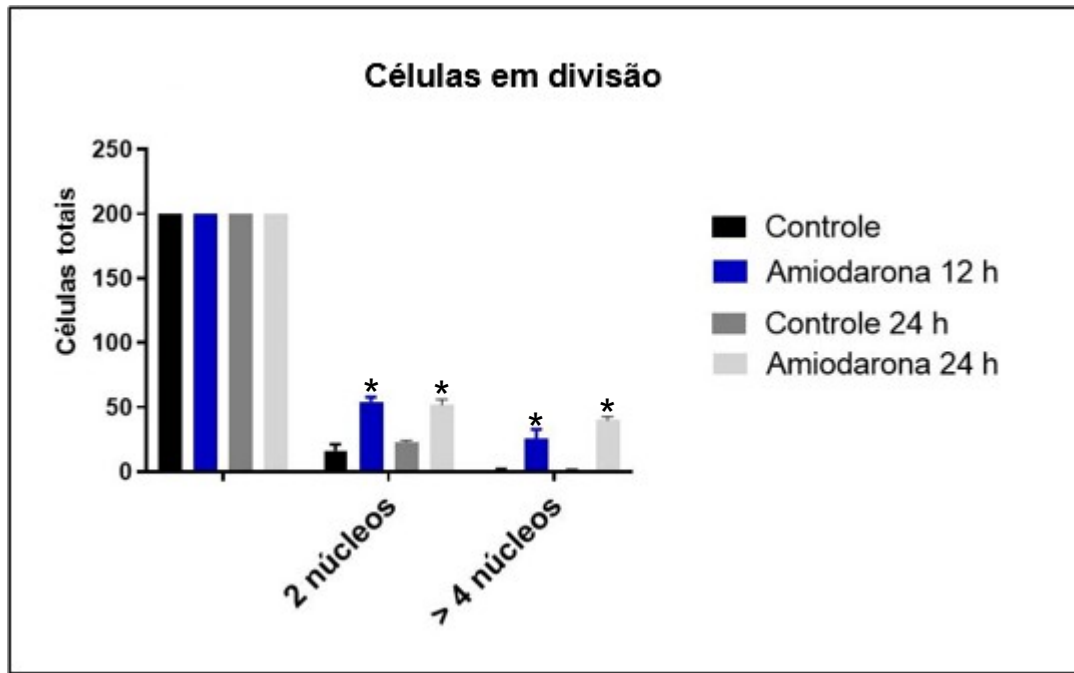
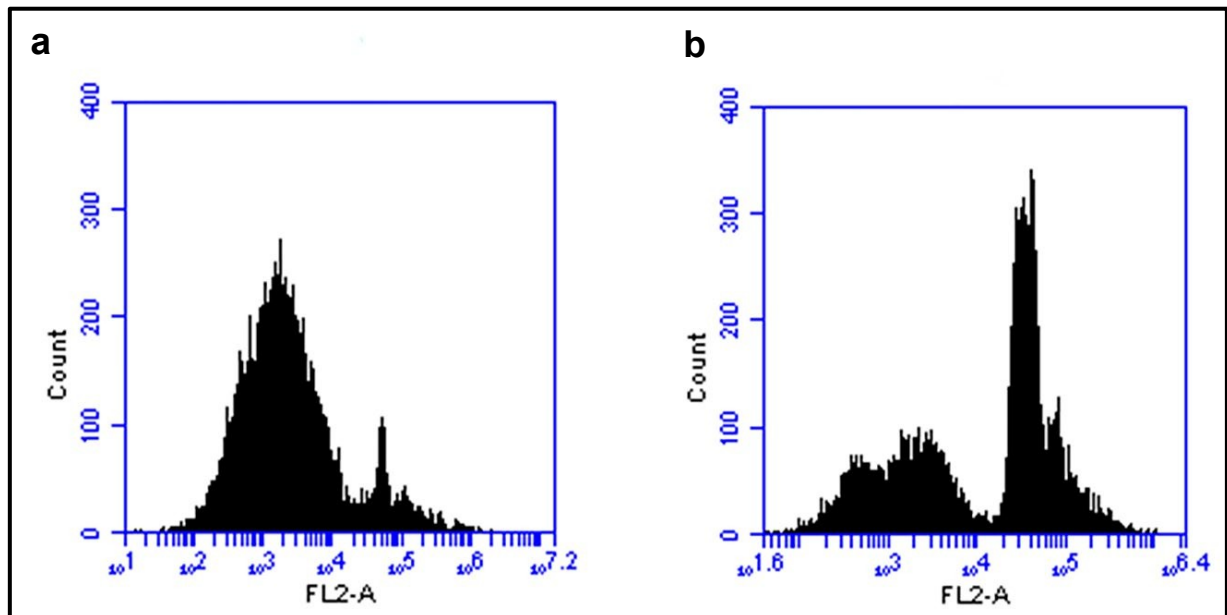


Figura 15. Contagem de parasitas polinucleados tratados com amiodarona a 10 μ M por 12 h e 24 h. Observa-se um grande número de células multinucleadas. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com seus respectivos controles (12 e 24 h) (* $p \leq 0,05$), N=200.



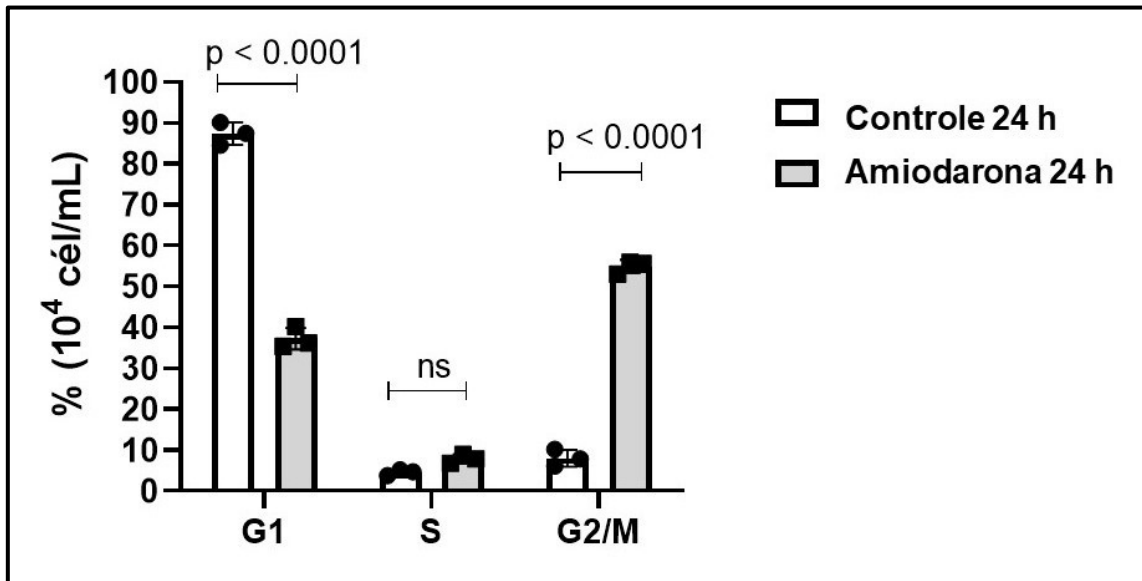


Figura 16. Ciclo celular de *T. vaginalis* tratadas com 10 μ M de amiodarona por 24 horas. Nota-se que as células tratadas (b) apresentaram uma diminuição em G1 quando comparadas com as células controle (a).

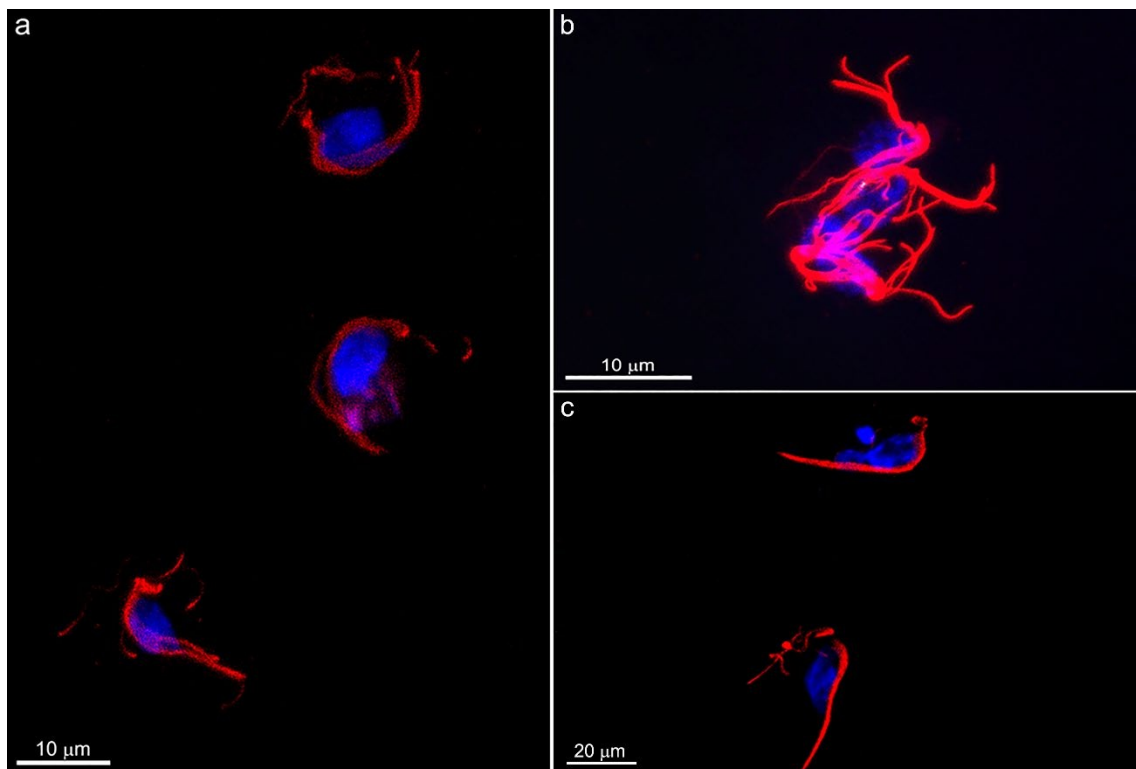


Figura 17. *T. vaginalis* controle (a) e tratadas com 10 μ M amiodarona por 24 horas (b-c) após incubação com anticorpo contra tubulina acetilada e observadas por microscopia de fluorescência confocal. Nota-se que os parasitas tratados estão em processo de divisão celular, apresentando estruturas celulares duplicadas (b) e múltiplos núcleos (c).

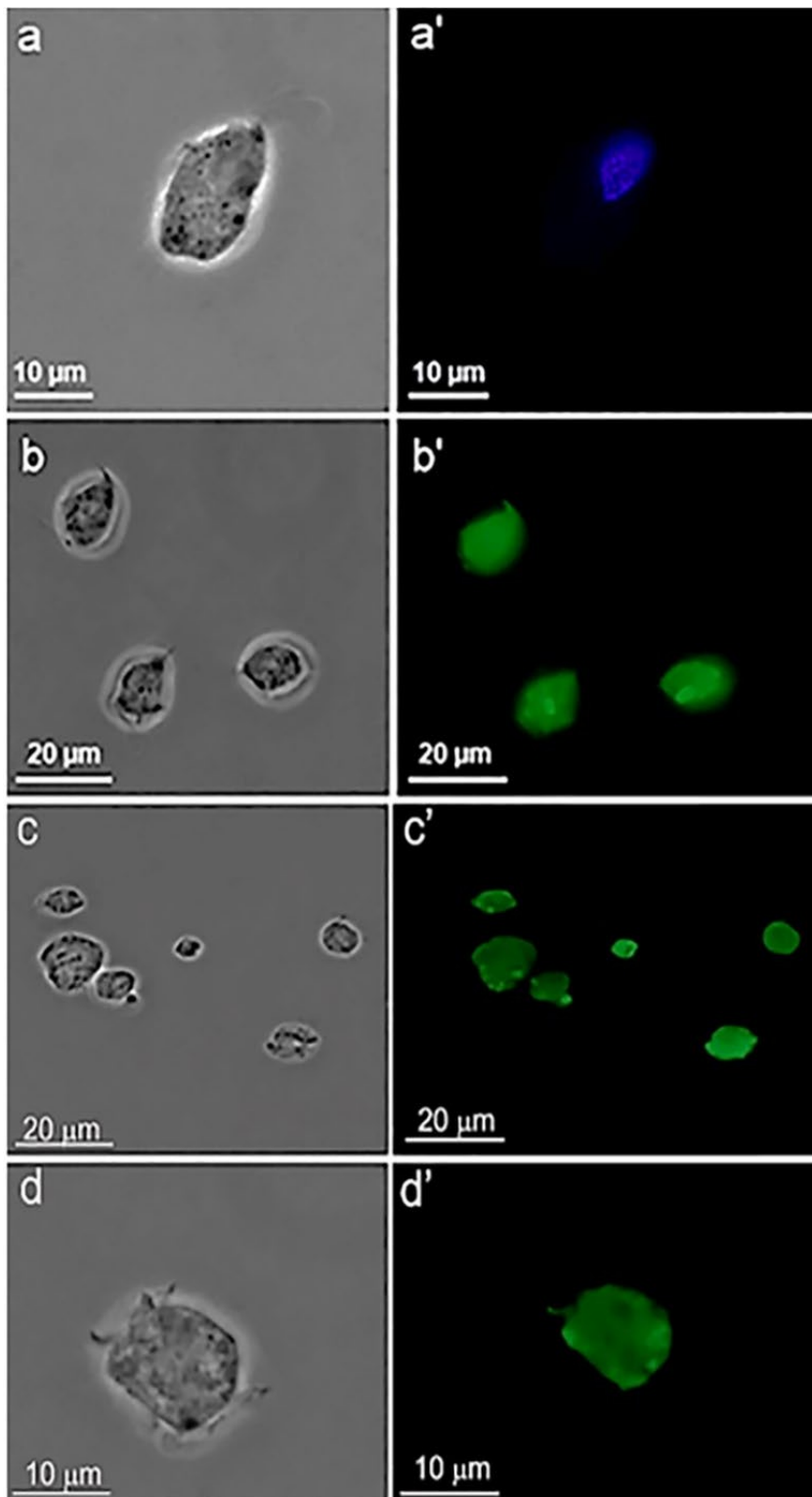


Figura 18. Teste TUNEL — marcação de DNA fragmentado. Células controle (a–a'). Controle positivo tratado com DNase I (b – b'). Microscopia de Fluorescência de *T. vaginalis* após o tratamento com 10 µM de amioder (c – c') e 10 µM de dronedarona (d – d') por 24 h. Resultados positivos para fragmentação de DNA.

5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para verificar os possíveis efeitos provocados pelos compostos na morfologia dos parasitos, foram feitos processamentos para microscopia eletrônica de varredura. A figura 19a mostra *T. vaginalis* exibindo uma morfologia normal, piriforme, com quatro fagelos anteriores e um flagelo recorrente. Parasitas incubados na presença de amiodarona formaram agregados celulares de vários tamanhos, alcançando até 80 μm (Fig. 19b-d). Parasitas incubados na presença de amioder ou dronedarona apresentaram células arredondadas e deformadas (Fig. 20b-d). Agregados celulares foram observados com dronedarona (Fig. 20 e-f).

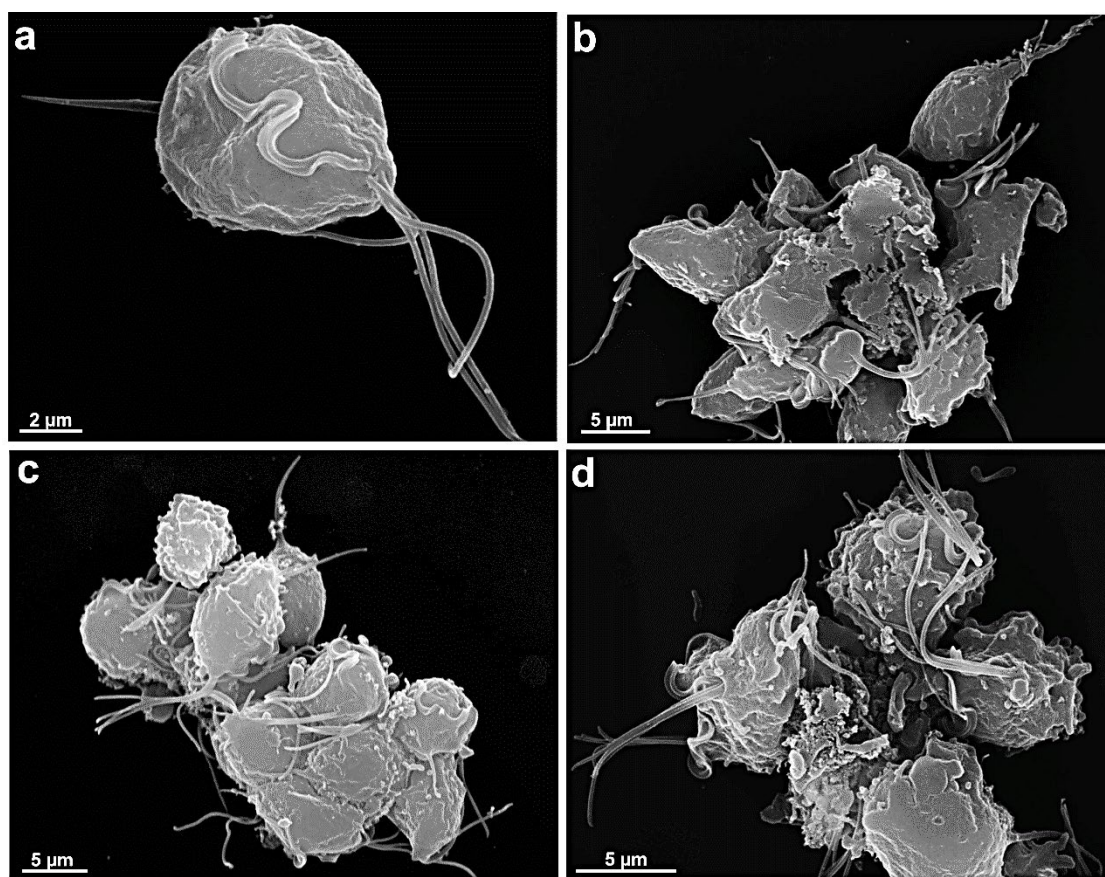


Figura 19. MEV de *T. vaginalis* controle (a) e tratadas com 10 μM de amiodarona por 12 h (b-d). Alterações morfológicas, células enrugadas e agregadas são observadas (b -d).

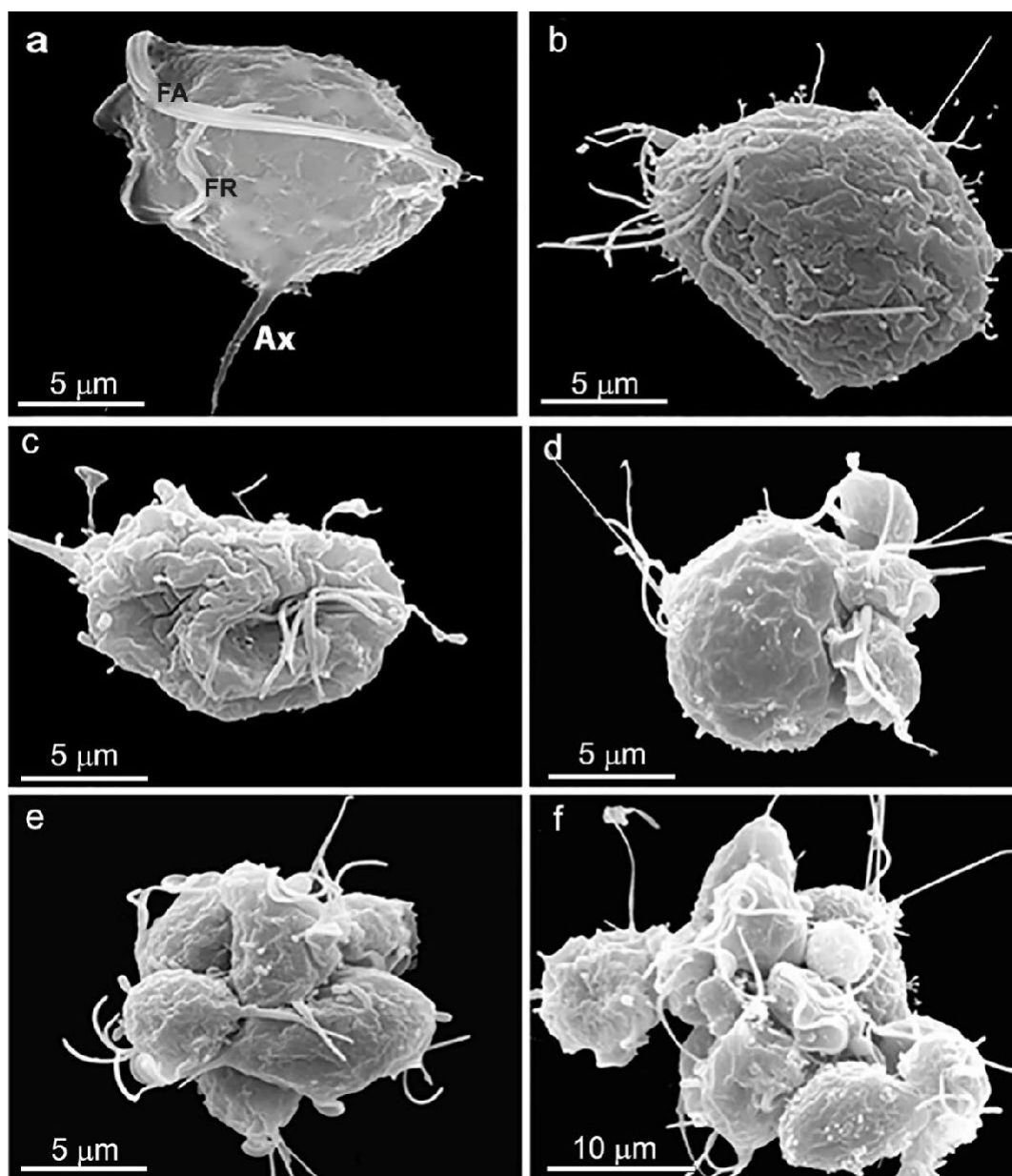


Figura 20. MEV de *T. vaginalis* controle (a) e após tratamento com 10 µM de amioder (b – c) e 10 µM de dronedarona (d – f) por 24 horas. Os parasitas apresentaram alterações morfológicas com células disformes e arredondadas (b – c) e agregados celulares (d – f). FA, flagelos anteriores; FR, flagelo recorrente; Ax, axóstilo.

5.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para verificar os possíveis efeitos provocados pelos compostos na ultraestrutura dos parasitos, foram realizados processamentos para microscopia eletrônica de transmissão. A figura 21a mostra uma imagem de MET de uma célula controle, onde as estruturas de *T. vaginalis* são observadas, como o núcleo, complexo de Golgi, hidrogenossomos, vacúolos e grânulos de glicogênio distribuídos por toda a célula.

Células tratadas com amiodarona mostraram hidrogenossomos localizados principalmente na periferia da célula (Fig. 21b e c), uma maior quantidade de agregados de grânulos de glicogênio e cromatina nuclear distribuída como estruturas densas (Fig. 21b e c) em vez da distribuição mais difusa observada em células não tratadas (Fig. 21a). Depois do tratamento com amiodarona por 24 horas, células multinucleadas (Fig. 22a) e aderidas entre si formaram uma organização semelhante a um tecido sem fusão celular (Fig. 22b). Os hidrogenossomos apresentaram formato alongado (Fig. 22c). Além disso, as células exibiram grandes massas de grânulos de glicogênio (Fig. 22d), identificados pelo método citoquímico de *Thiéry* que revela carboidratos (Fig. 23a e b). Após o tratamento com dronedarona a análise por MET mostrou as células com os hidrogenossomos exibindo uma matriz esvaziada, quando comparados com células não tratadas (Fig. 24).

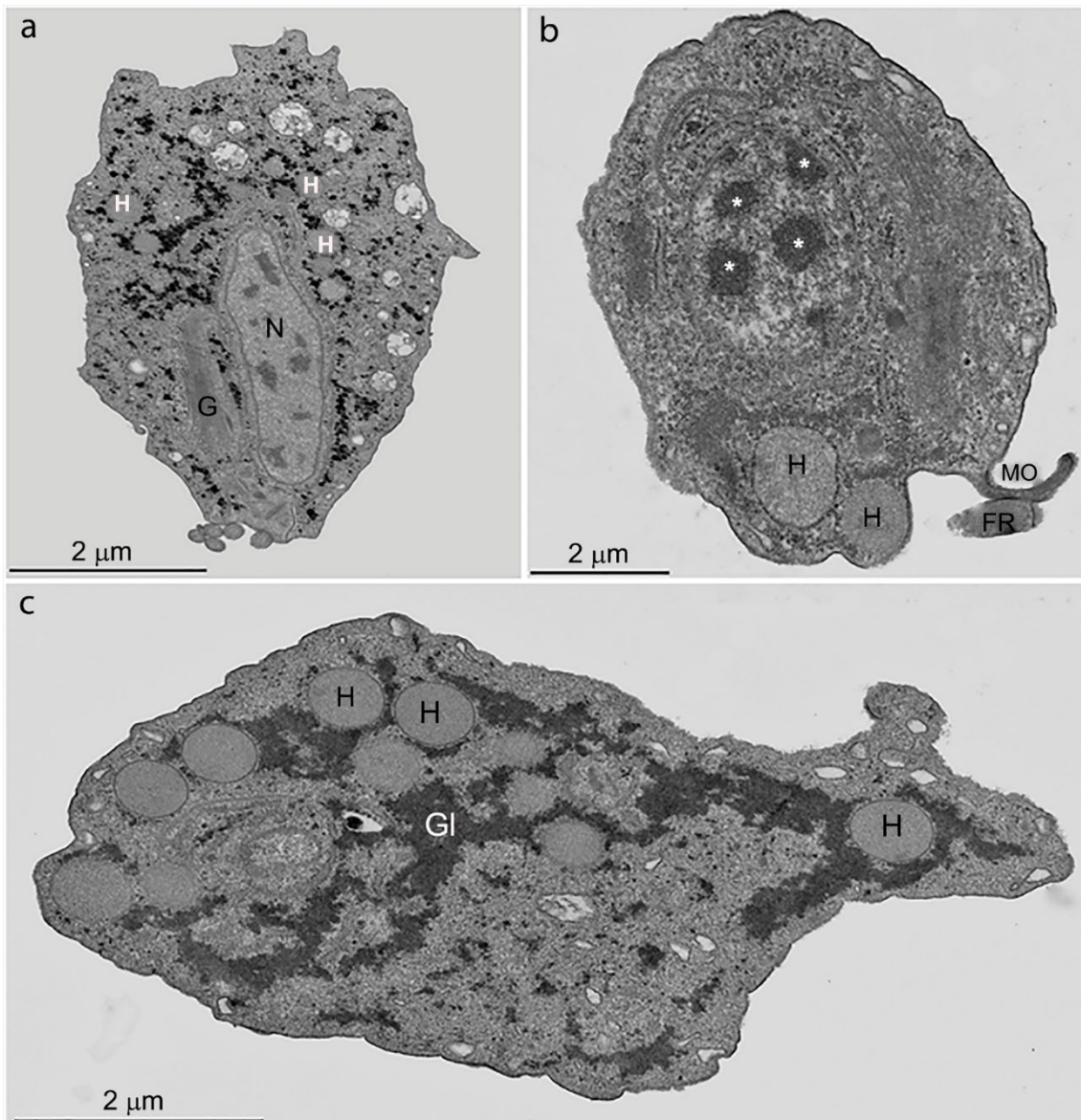


Figura 21. MET de *T. vaginalis* controle (a) e após tratamento com 10 µM de amiodarona 12 h (b-d). (a) Controle exibindo organelas sem alterações com hidrogenossomos (H) arredondados com matriz de densidade normal. (b-c) Células tratadas apresentando grandes massas de cromatina condensada (asteriscos); e (b) (c) acúmulo de grânulos de glicogênio (GI). G, Golgi; MO, membrana ondulante; FR, Flagelo recorrente; N, núcleo.

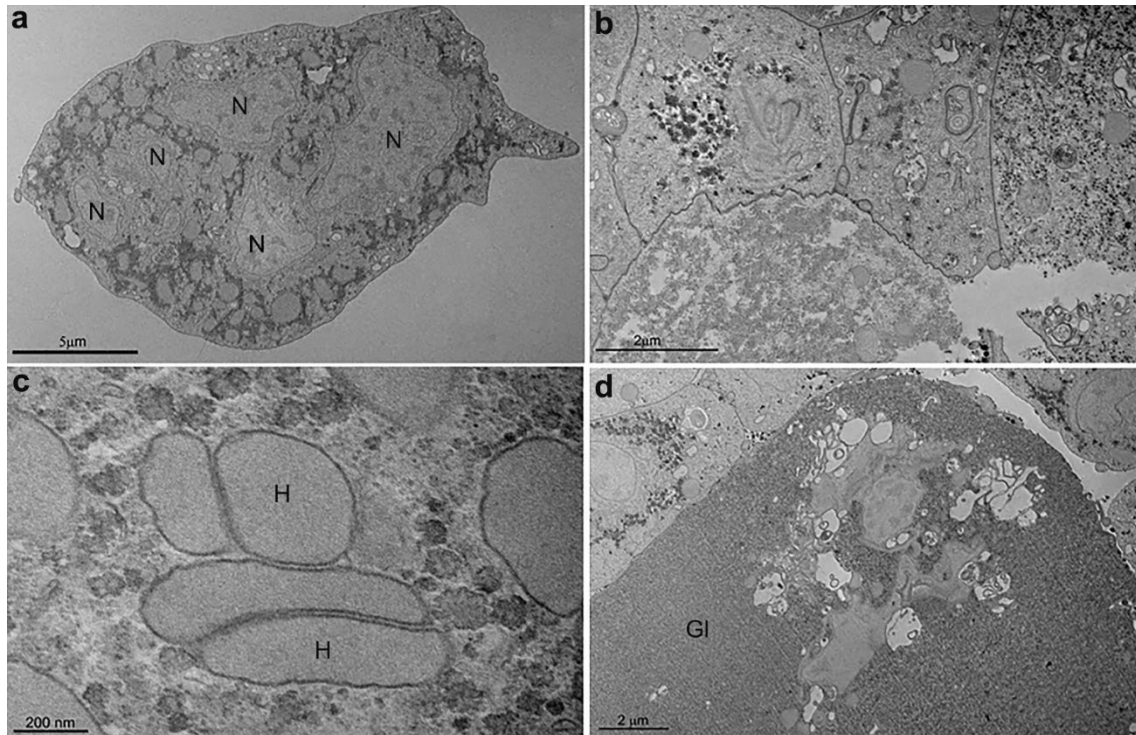


Figura 22. MET de *T. vaginalis* tratadas com 10 µM de amiodarona por 24 h. **(a)** *T. vaginalis* multinucleada; **(b)** células aderidas; **(c)** hidrogenossomos alongados **(H)**; **(d)** grandes massas de glicogênio **(GI)**. **N**, núcleo.

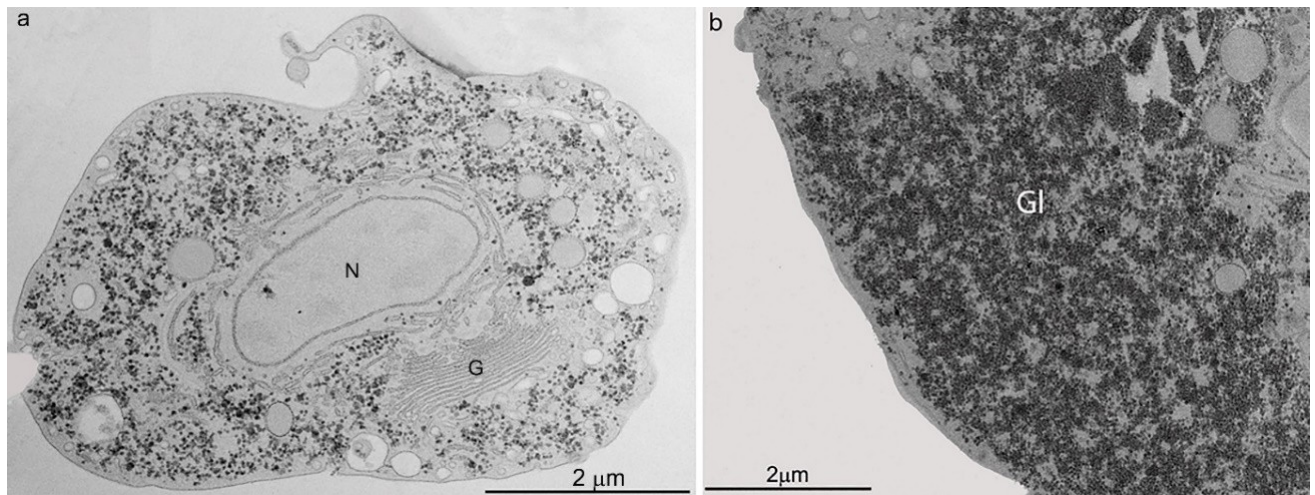


Figura 23. **(a-b)** MET após técnica de *Thiéry* para detecção de carboidratos em *T. vaginalis* tratadas com amiodarona 10 µM por 24 h. Reação positiva em glicogênio **(GI)**, Golgi **(G)** e membranas celulares.

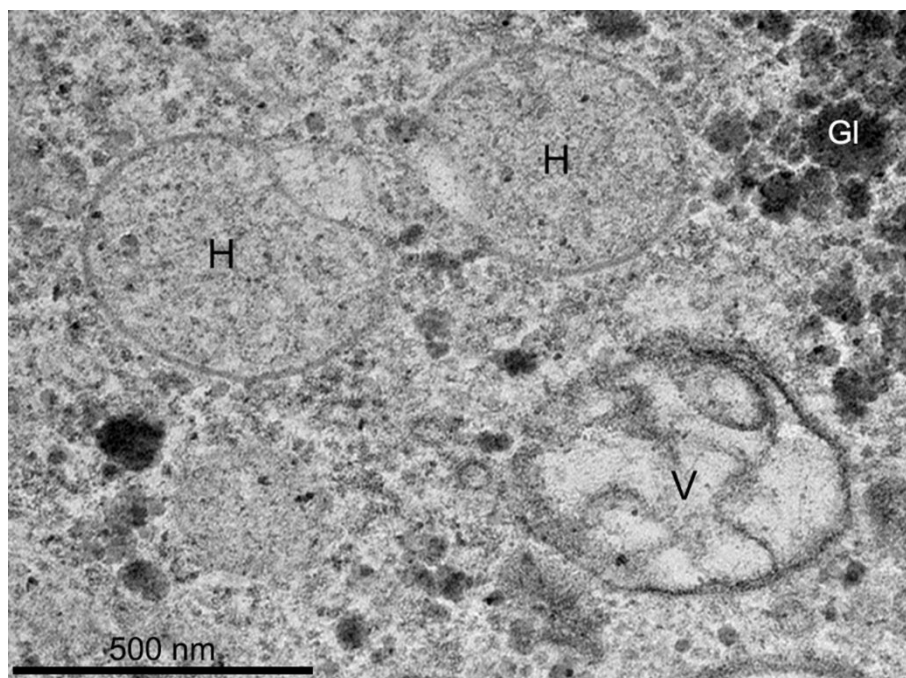


Figura 24. MET de *T.vaginalis* após o tratamento com o composto dronedarona 10 μ M por 24 h. Os hidrogenossomos (**H**) apresentam um aspecto alterado com sua matriz esvaziada. (**Gl**), glicogênio, (**V**), vacúolo.

5.7. Resultados com a droga SQ109

5.7.1 Curva de crescimento

Para verificar os possíveis efeitos provocados pelo composto realizamos curvas de crescimento com diferentes concentrações (1, 5, 10 e 20 μ M) de SQ109 em *T. vaginalis*. O MTZ, que foi utilizado como controle positivo, mostrou um efeito inibitório significativo com um valor de IC_{50} de 2,5 μ M após 48 h. Observamos um efeito inibitório dose dependente do composto SQ109 com um IC_{50} de 3,15 μ M. A 10 μ M, a inibição foi semelhante, próxima a 2 μ M de MTZ (Fig. 25).

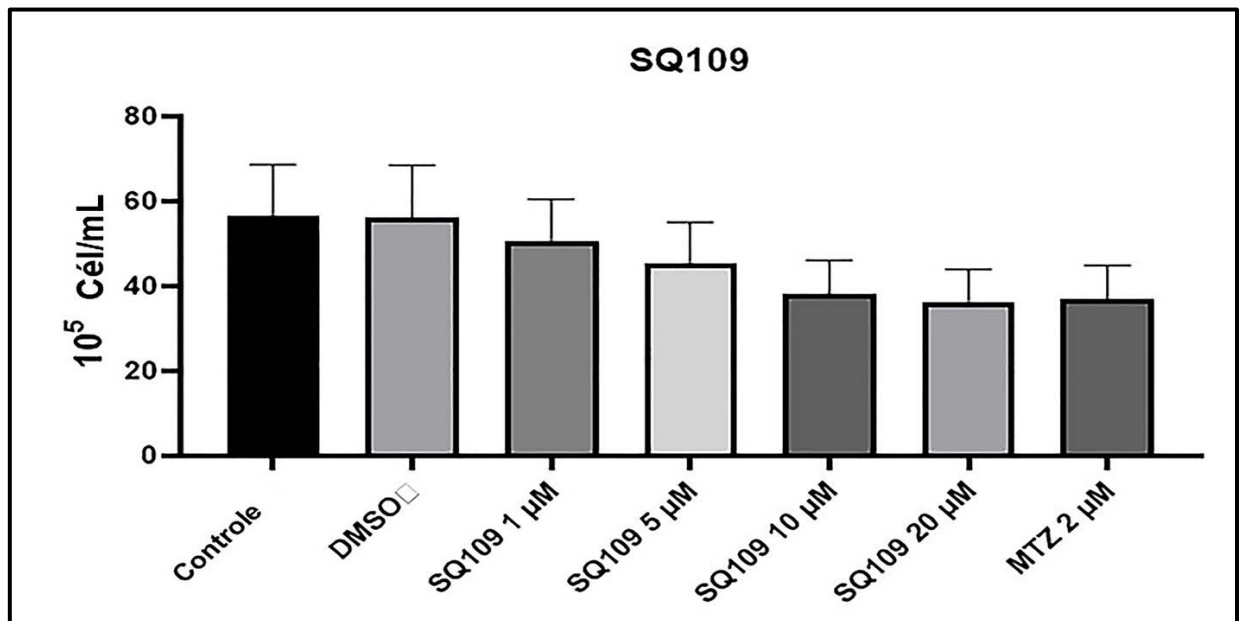


Figura 25. *T. vaginalis* controle e tratadas com DMSO 0,1%, 1, 5, 10, 20 μM de SQ109 e 2 μM de metronidazol (MTZ). Dados são expressos como média ± SEM (N=3).

5.8. Imunofluorescência

A observação por microscopia de fluorescência com DAPI indicou que o composto SQ109 induziu a formação de agregados celulares. Observamos que as células agregadas exibiram núcleos individuais (Fig. 26b').

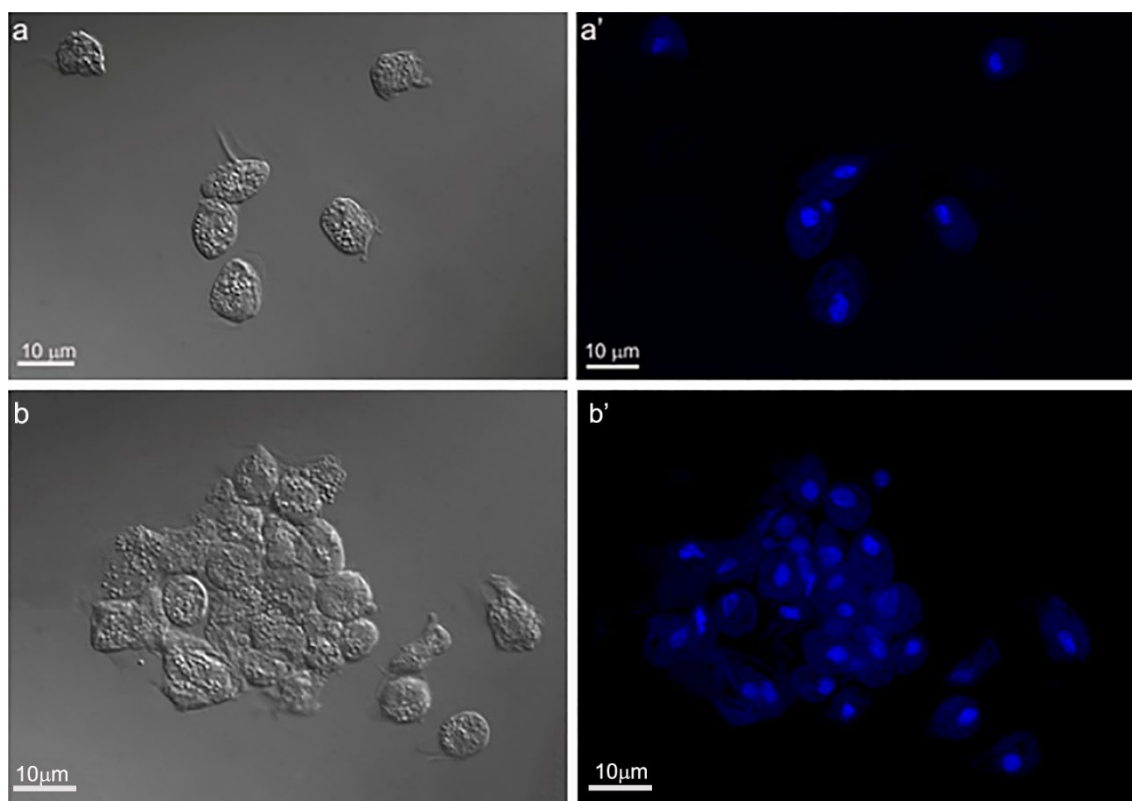


Figura 26. *T. vaginalis* observadas por microscopia de fluorescência confocal, com DIC (a-b) e DAPI (a'-b'). Células controle (a-a') e tratadas com 10 μM de SQ109 por 24 h (b-b') onde se observam agregados celulares.

5.8.1. Viabilidade celular usando 7-AAD e FDA

Para verificar se o tratamento com SQ109 reduziria a viabilidade celular, 7-AAD e FDA foram usados simultaneamente. Células com membranas celulares intactas, são consideradas viáveis, absorvem o corante FDA e apresentam fluorescência verde. Em contrapartida, células com membrana não funcional ou comprometida incorporam o corante 7-AAD e apresentam fluorescência vermelha e são consideradas inviáveis. Como observado na figura 27 as células sem tratamento apresentaram apenas fluorescência verde, não apresentando marcação com 7-AAD. Em contraste, *T. vaginalis* tratadas com o composto SQ109 apresentou marcação para 7-AAD em fluorescência vermelha.

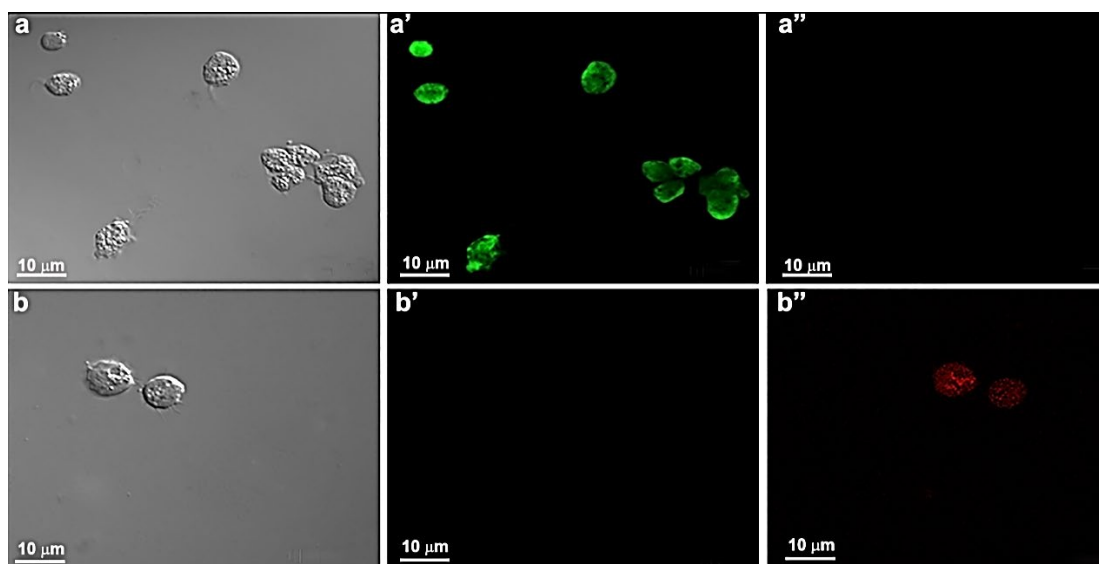


Figura 27. Comparação de *T. vaginalis* controle e tratadas com SQ109 por 24 h incubadas com 7-AAD e FDA. DIC (**a-b**). Microscopia de fluorescência usando FDA (**a'-b'**) e 7-AAD (**a''-b''**). Os parasitas controle (**a'**) são positivos para FDA (**a'**), mas não para 7-AAD (**a''**). Em contraste, os parasitas tratados com SQ109 (**b**) são negativos para FDA (**b'**) e positivos para 7-AAD (**b''**).

5.8.2 Viabilidade do hidrogenossomo usando JC-1

Testes de viabilidade utilizando o corante fluorescente JC-1 foram realizados em *T. vaginalis* controle e tratadas com SQ109 (Fig. 28) para verificar possíveis alterações induzidas por SQ109 nos hidrogenossomos. No presente estudo observamos que os hidrogenossomos funcionais encontram-se marcados em vermelho. Em contraste, foram observados hidrogenossomos em verde após o tratamento com SQ109 (Fig. 28c), indicando uma perda do potencial de membrana hidrogenossomal. Ao utilizar o CCCP (cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona), que é um desregulador do potencial da membrana mitocondrial, como controle positivo confirmamos a resposta do corante JC-1 (Fig. 28b).

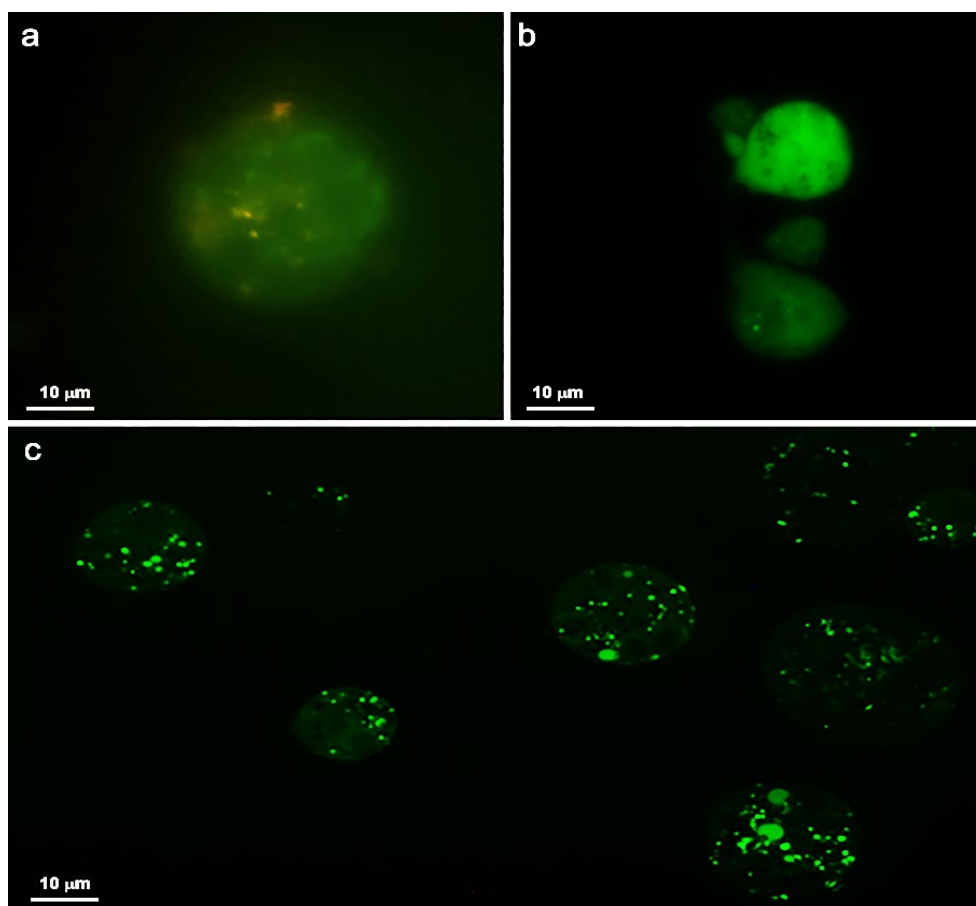


Figura 28. Parasitas tratados com JC-1 observados por microscopia de fluorescência. **(a)** Controle, células sem tratamento. Os hidrogenossomos apresentam leve fluorescência vermelha. **(b)** Controle positivo, células tratadas com o agente desacoplador CCCP. **(c)** Células tratadas com o composto SQ109. Os hidrogenossomos apresentam fluorescência verde indicando uma perda do potencial de membrana hidrogenossomal.

5.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após o tratamento de *T. vaginalis* com SQ109 e observação por microscopia eletrônica de varredura as células apresentaram-se arredondadas, em contraste com os parasitas controle piriformes (Fig. 29) e alterações na superfície celular.

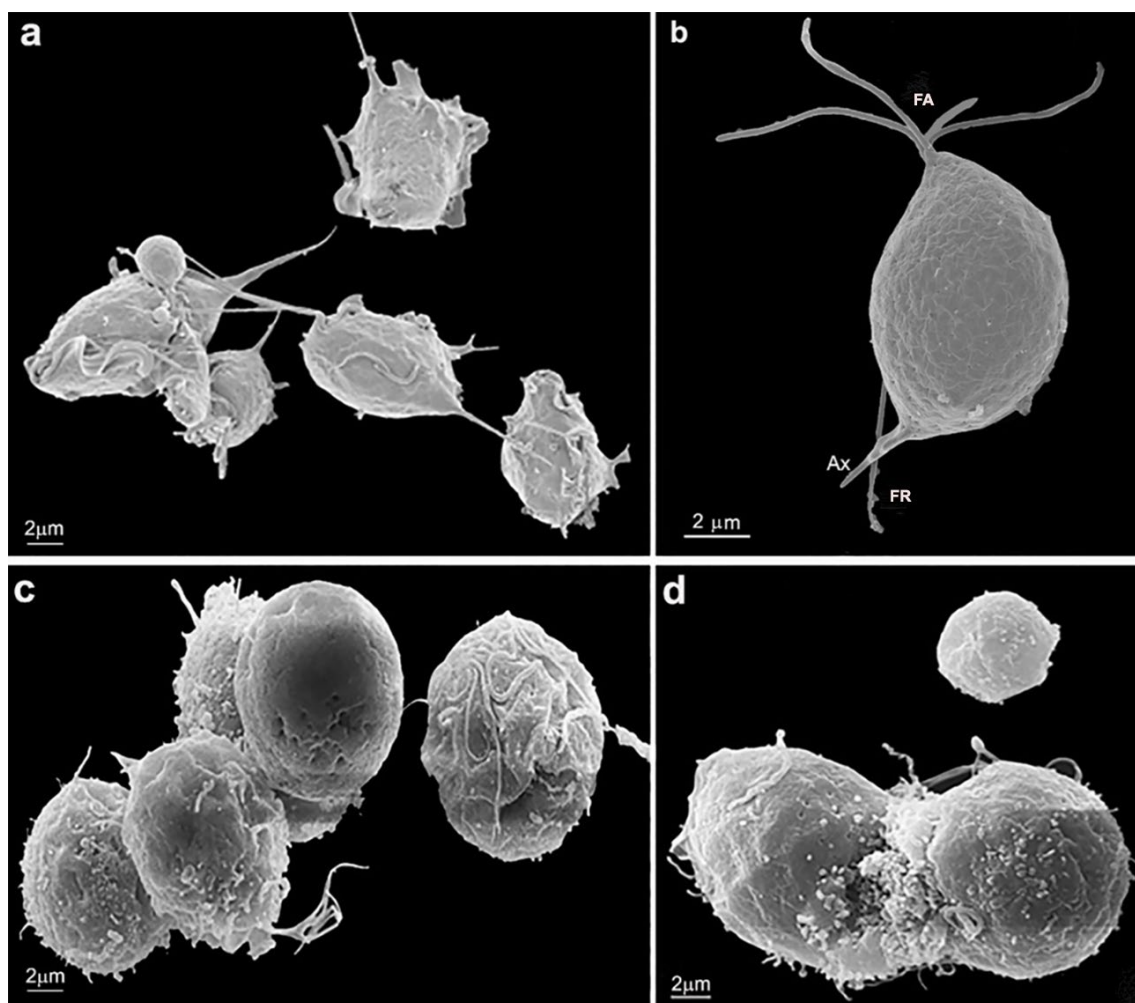


Figura 29. MEV de *T. vaginalis* controle (a-b) e tratadas com 10 µM de SQ109 por 24h (c-d). Notam-se células arredondadas e alterações morfológicas. FA, flagelos anteriores; FR, flagelo recorrente; Ax, axóstilo.

5.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelou um aumento significativo no número e tamanho dos hidrogenossomos em células tratadas com o composto SQ109 a 10 µM por 24 h (Figs. 30 e 32). Para

comprovar esta observação, realizamos uma análise morfométrica (Fig. 31) usando uma amostra estatisticamente significativa onde pelo menos vinte células foram examinadas de cada ponto experimental, ou seja, células controle e tratadas com o composto SQ109. A média do diâmetro dos hidrogenossomos de células controle e tratadas foi de 400 nm e 700 nm, respectivamente, indicando um aumento significativo no tamanho da organela. Além disso, a área ocupada na célula pelos hidrogenossomos, apresentou valores médios de 0,5 e 1,5 μm^2 para células controle e tratadas, respectivamente. Em relação ao volume ocupado pelo hidrogenossomos, obtivemos valores médios de 2,6 μm^3 (células controle) e 4,4 μm^3 (células tratadas) (Fig. 31 a- c). Esses resultados apontam na direção a uma resposta celular significativa afetando os hidrogenossomos sob o tratamento com o composto SQ109.

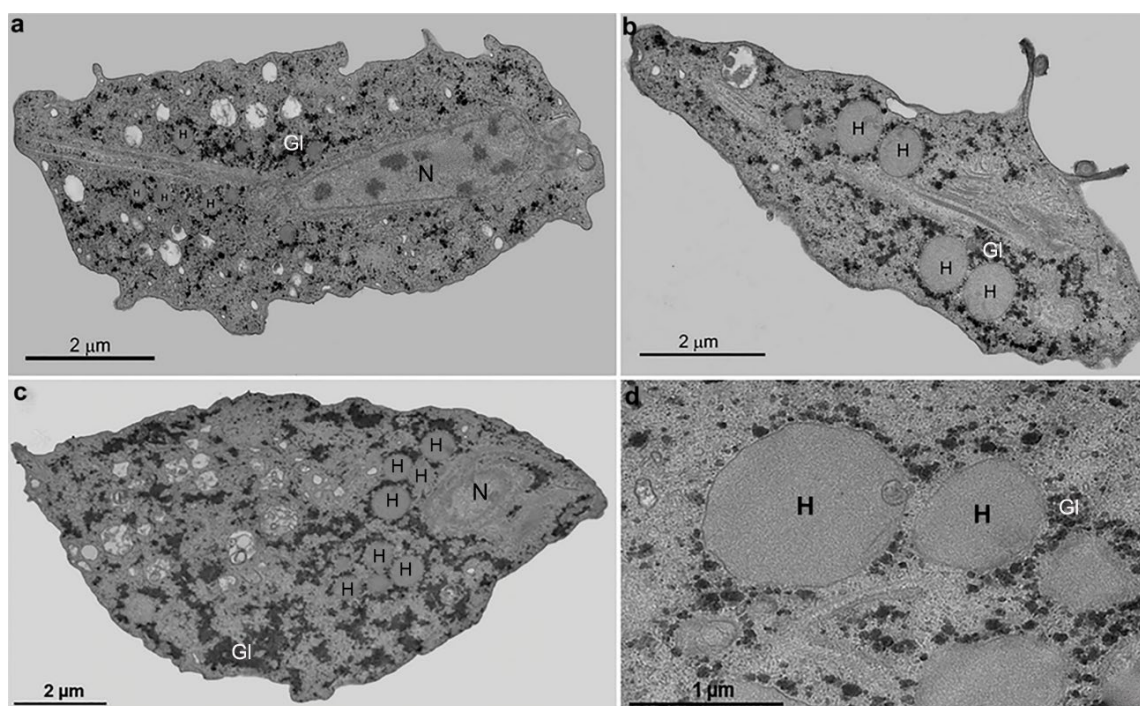


Figura 30. MET de *T. vaginalis* tratadas com 10 μM SQ109 por 24 h. (a) Célula controle e tratadas (b- d) com 10 μM de SQ109, quando notam-se aumento do número de hidrogenossomos, alterações morfológicas e acúmulo de grânulos de glicogênio (GI), N, núcleo H, hidrogenossomo.

5.10.1. Morfometria

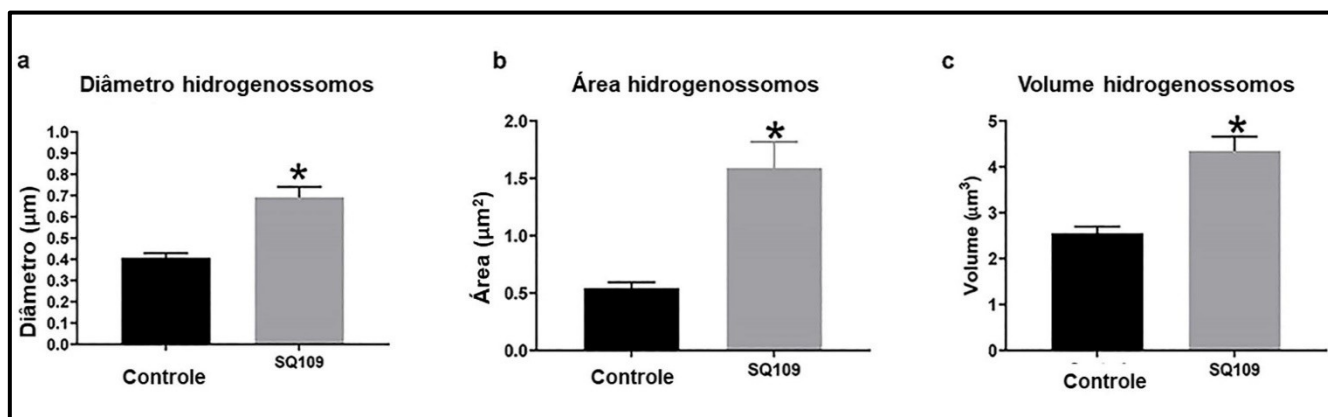


Figura 31. Análise morfométrica dos hidrogenossomos após tratamento com o composto SQ109 a 10 μM (a–c). Foi encontrado aumento significativo no diâmetro médio dos hidrogenossomos, da área superficial média e do volume médio que ocupam nas células tratadas quando comparados com as células sem tratamento (controle).

5.10.2. Técnica de Thiery

A microscopia eletrônica de transmissão mostrou que a superfície do hidrogenossomo estava coberta por pequenas partículas densas (Fig. 32 b-c). Essas partículas foram identificadas como grânulos de glicogênio concentrados em torno dos hidrogenossomos bem como alterações no tamanho dessa organela e na sua membrana envoltora (Fig. 32 b-c).

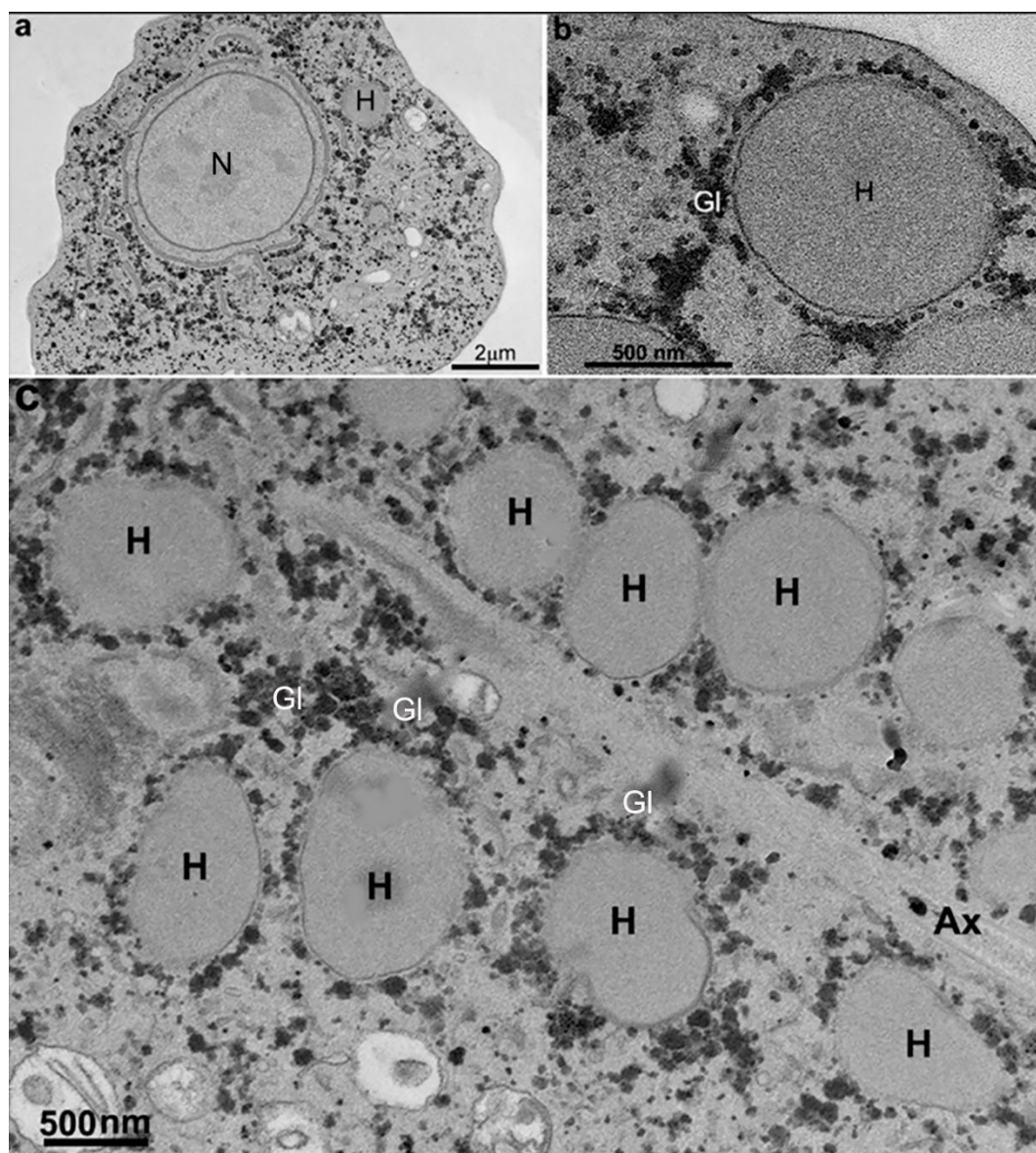


Figura 32. MET após técnica de *Thiery* para detecção de carboidratos em *T. vaginalis* tratadas com 10 μ M de SQ109 por 24 h. Reação positiva foi observada em grânulos de glicogênio (Gl) e membranas celulares. H, hidrogenosomos; N, núcleo; Ax, axóstilo.

5.11. Ancoragem molecular

A partir das análises bioinformáticas preliminares que preveem a proteína ferredoxina de *T. vaginalis* (TvFd) como um alvo potencial para SQ109 e metronidazol, realizamos análises adicionais usando moléculas de simulação de acoplamento. Foi realizado um processo de *redocking* entre o cristal da proteína e seu ligante natural, o complexo [2Fe-2S], para determinar os resíduos de interação e assim identificar a posição e tamanho da caixa, bem

como verificar a energia de afinidade entre as moléculas e, finalmente, comparar esses resultados com os da simulação de ancoramento entre TvFd e os compostos SQ109 e MTZ. A figura 33 mostra a estrutura do TvFd e seu ligante natural acoplado. Os resíduos de interação entre TvFd e os compostos MTZ e SQ109 são demonstrados na Fig. 34. Para melhor visualização e interpretação dos resultados, apresentamos a Tabela 5. Nesta tabela, podemos observar o valor da energia de interação energia entre os resíduos (em sua melhor posição) e os resíduos da proteína TvFd com a qual os ligantes interagem.

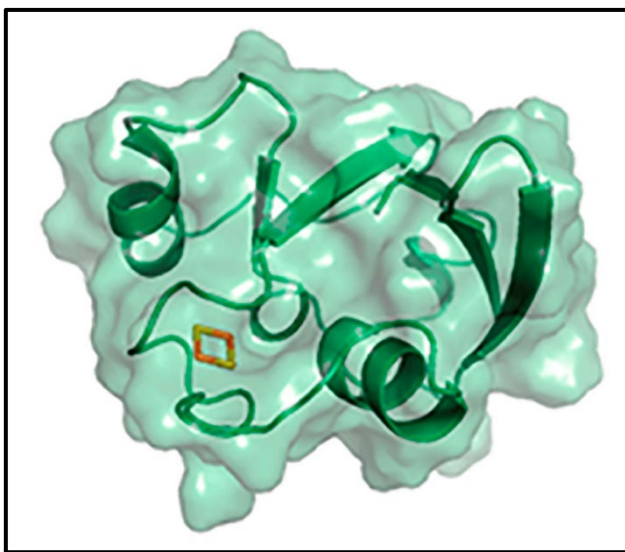


Figura 33. TvFd (verde) com seu ligante natural [2Fe-2S] (amarelo e laranja) posicionado no sítio ativo da cadeia A da proteína, código PBD 1L5P, 2,20 Å (Imagem gerada e colorida por PYMOL).

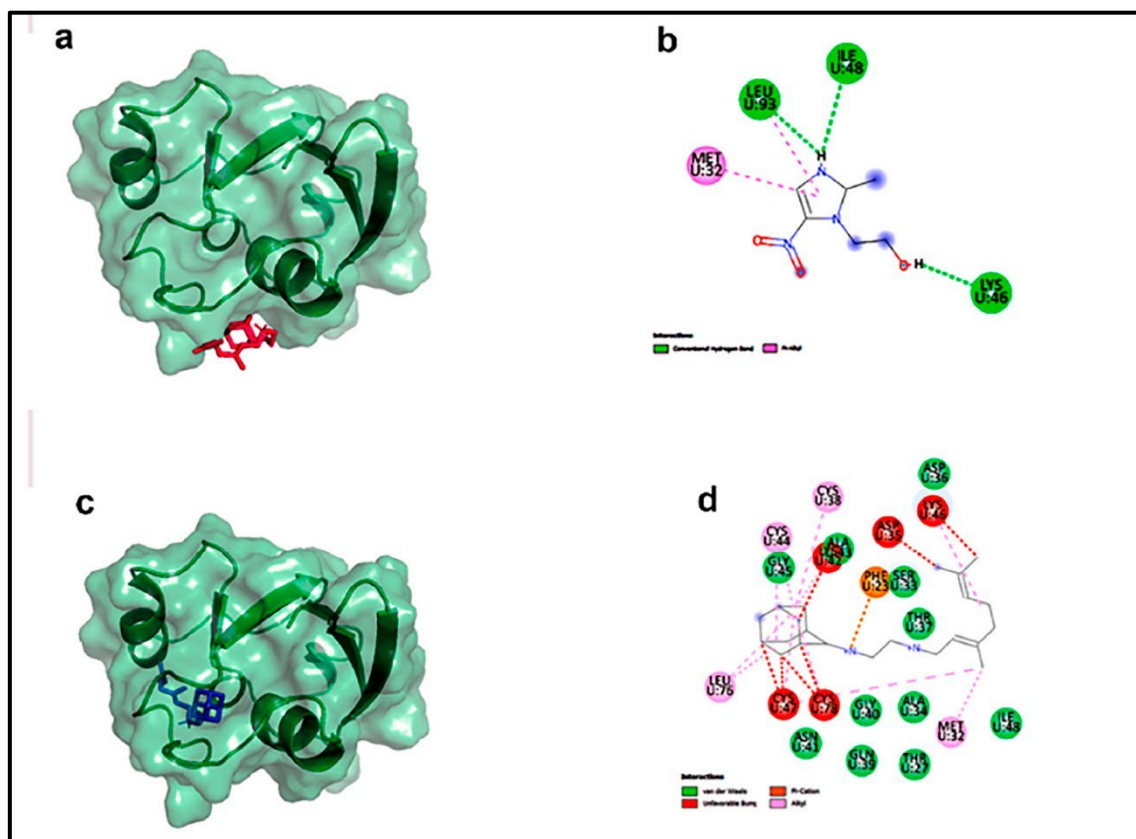


Figura 34. Resíduos de interação entre TvFd e os compostos MTZ **a** – interações com Met32, Lys46, Ile48 e Leu93 (**b**); e SQ109 (**c**) – interações com Phe23, Thr27, Met32, Ser33, Ala34, Asp35, Asp36, Thr37, Cys38, Gln39, Gly39, Gly40, Asn41, Lys42, Ala43, Cys44, Gly45, Lys46, Cys47, Ile48, Leu76, Cys78 (**d**). Imagens geradas por PYMOL e DISCOVERY STUDIO 2021.

Tabela 5. Valores das energias de interação entre os resíduos (na sua melhor posição) e os resíduos da proteína TvFd com os quais os ligantes interagem.

	[2Fe2S]	Metronidazol	SQ109
Energy (kcal/mol)	−2,0	−3,8	−4,6
Phe23	X		X
Thr27			X
Met32		X	X
Ser33			X
Ala34			X
Asp35			X
Asp36	X		X
Thr37	X		X
Cys38	X		X
Gln39	X		X
Gly40			X
Asn41	X		X
Lys42	X		X
Ala43			X
Cys44	X		X
Gly45			X
Lys46	X	X	X
Cys47	X		X
Ile48		X	X
Phe66	X		
Leu76	X		X
Cys78	X		X
Leu93		X	

5.12. Análogos de fosfolipídios (APL)

5.12.1 Curvas de crescimento

Foi realizado um ensaio piloto com todos os análogos de fosfolipídios, LDT10, LDT117, LDT118 e LDT34, nas concentrações de 10 µM por 24h e 48h de tratamento (Fig. 35a). Verificamos que os compostos LDT117 e LDT134 apresentaram maior eficácia na inibição da proliferação do parasito (Fig. 35b-c), com um IC₅₀ de 4,48 µM e 5,67 µM em 48h respectivamente.

a

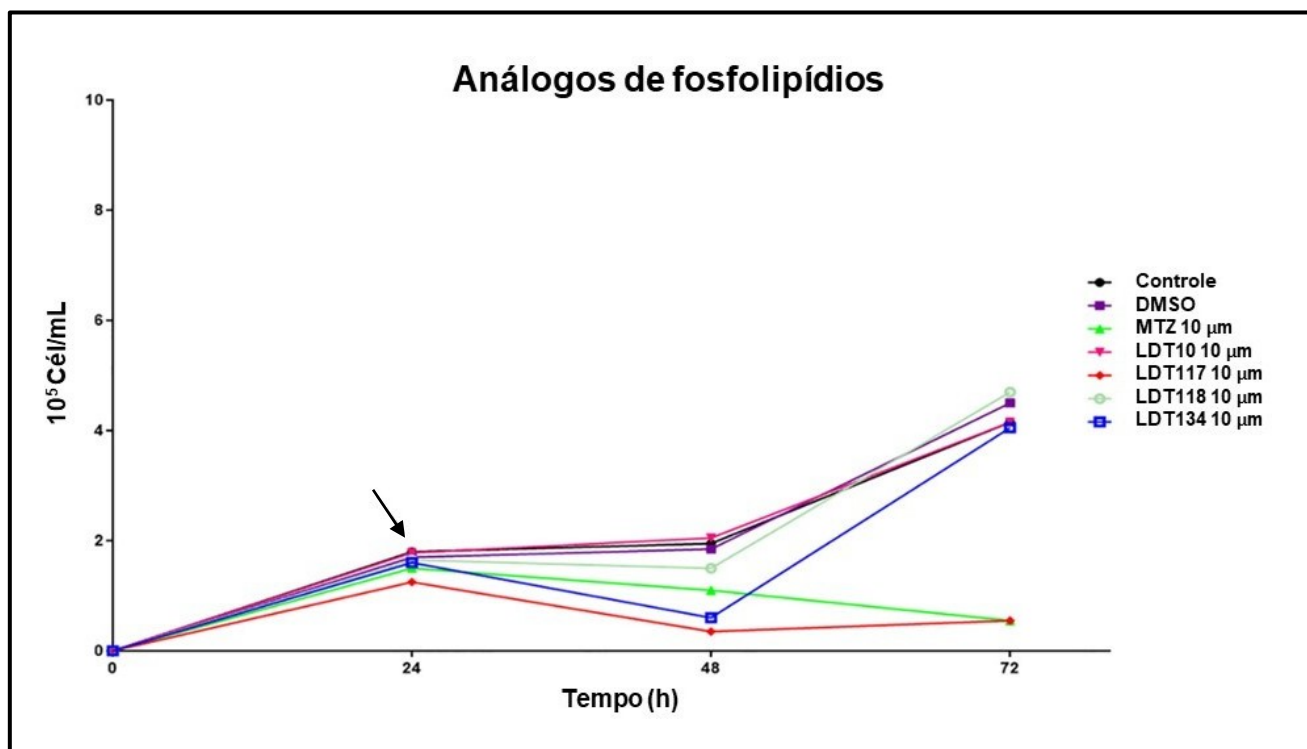


Figura 35. (a) *Screening* inicial para avaliar o crescimento de *T. vaginalis* controle e com a adição dos compostos. As culturas controle (controle e DMSO 0,1%) cresceram durante todo o tempo de experimento. As culturas tratadas com os compostos apresentaram uma diminuição significativa no crescimento dos parasitas na concentração a 10 μM dos compostos durante o tratamento. Nota-se que com 24 h de tratamento com o composto LDT117 a cultura apresenta diminuição na proliferação enquanto a cultura tratada com o composto LDT134 houve um aumento na proliferação.

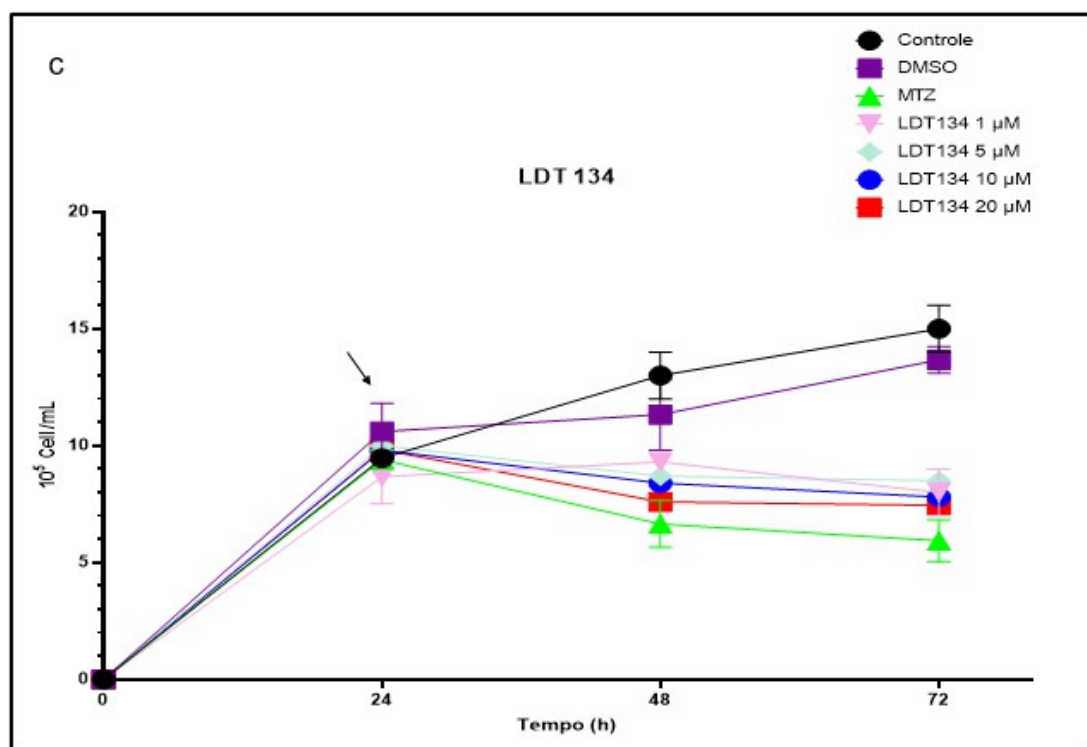
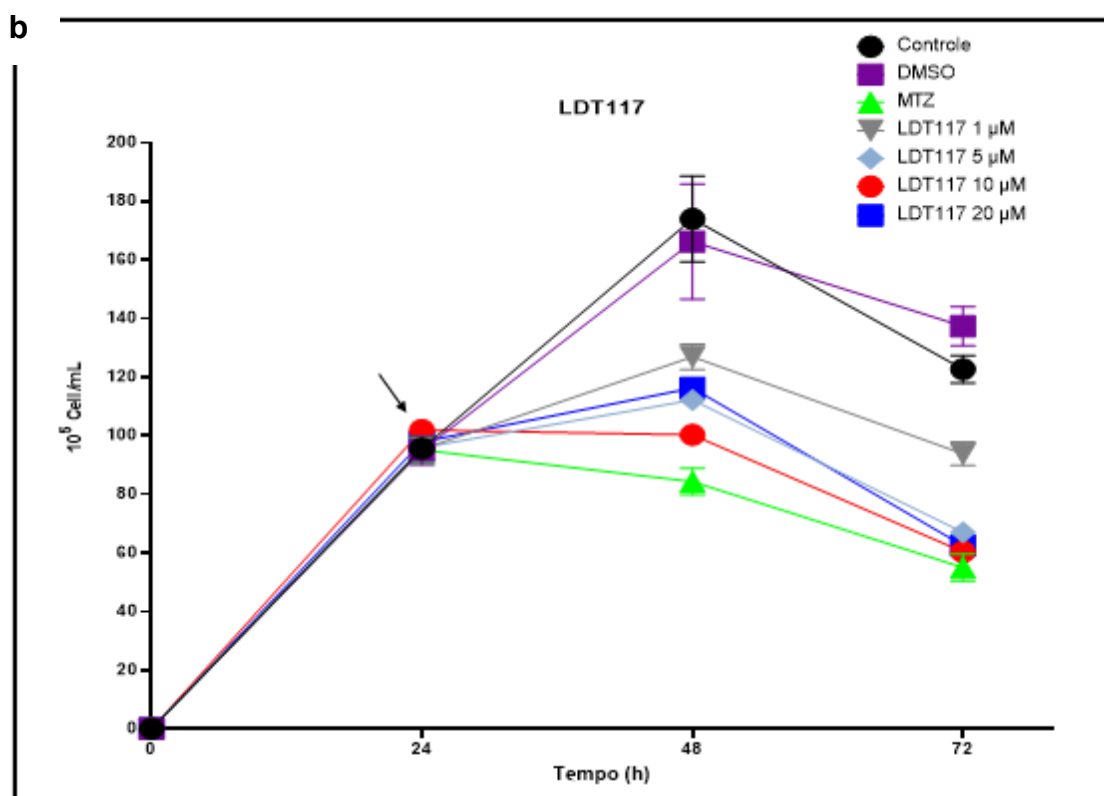


Figura 35. (b - c) *T. vaginalis* controle, tratadas com DMSO 0,1%, com 1, 5, 10 e 20 μ M de LDTT117 e LDT134 e 2 μ M de metronidazol (MTZ). As setas indicam o momento da adição do composto (24 e 48 h). As culturas tratadas com LDT117 e LDT1134 apresentaram uma diminuição significativa no crescimento. O nmulo dos

parasitas foi determinado usando o microscópio óptico e um hemocítômetro. Dados são expressos como média $\pm$ SEM (N=3).

5.12.2 Ensaio de citotoxicidade

Avaliamos a citotoxicidade dos compostos em células de linhagem de mamífero LLCMK₂ tratando com os compostos APL LDT117 e LDT134 por 48 horas. Observamos reduções significativas nas concentrações de 50 e 100 μ M (LDT117) e 100 μ M (LDT134), no entanto, não observamos em concentrações menores (Fig. 36a-b).

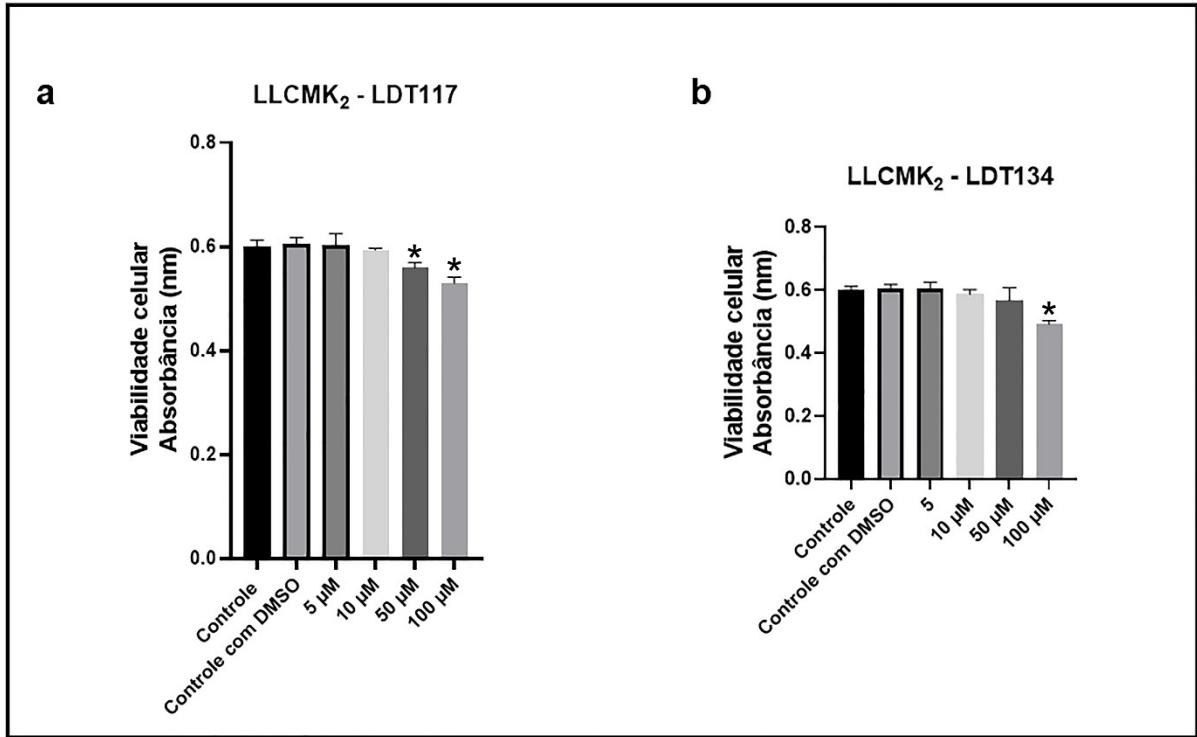


Figura 36. Viabilidade celular de células de mamífero LLC-MK2 tratadas com os compostos LDT117 (a) e LDT134 (b) por 48h. Absorbância: 490-500 nm. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao controle (* $p \leq 0,05$), N=3.

5.13. Imunofluorescência

O ensaio do TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP *Nick-end labeling*) foi utilizado para verificar se os compostos LDT117 e LDT134, que inibiram o crescimento celular de *T. vaginalis*, induziam a morte celular por um mecanismo semelhante ao de apoptose. Os controles positivos foram tratados com DNase I, enquanto para os controles negativos foram marcados com o fluorocromo que não possui a enzima terminal transferase. A figura 37-a' indica células controle, onde nenhuma marcação foi observada. A figura 37b-b' mostra um controle positivo de células tratadas com DNase, onde foi observada marcação positiva. Além disso, *T. vaginalis* tratadas com 10 µM de LDT117 (Fig. 37c-c') ou LDT134 (Fig. 37d-d') por 24 h também apresentaram marcação quando se utilizou a técnica do TUNEL, sugerindo a indução de morte por um mecanismo semelhante a apoptose.

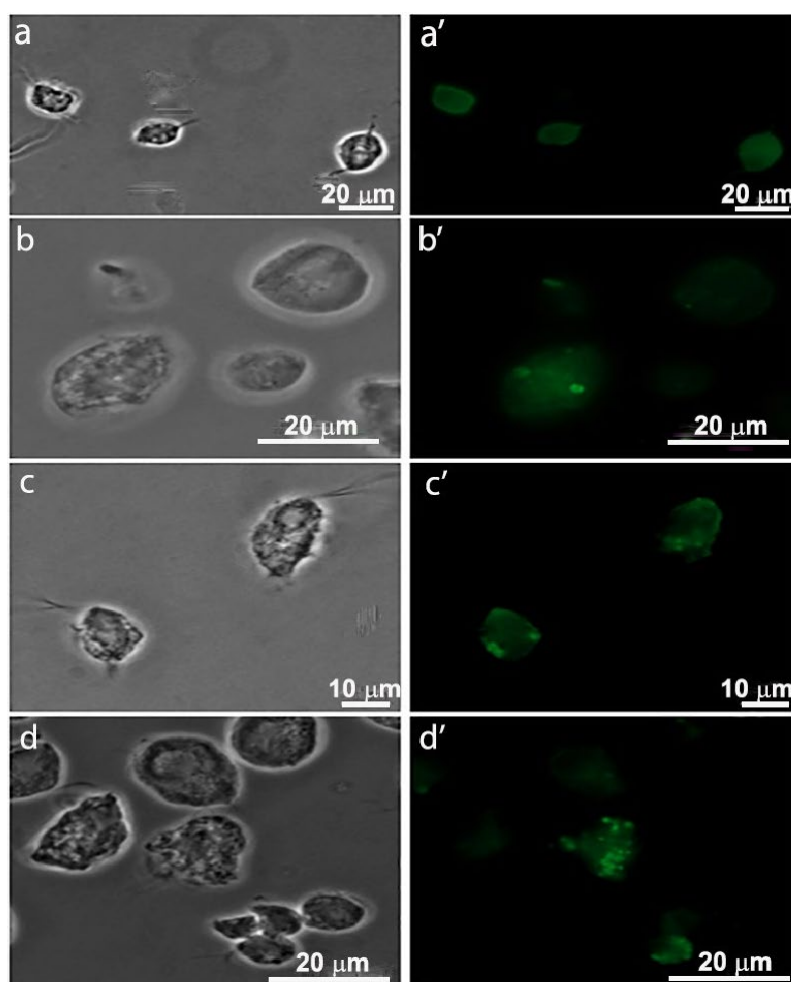


Figura 37. Ensaio do TUNEL — marcação de DNA fragmentado. Células controle (a–a'). Controle positivo tratado com DNase I (b – b'). Microscopia de Fluorescência de *T.*

2137 *vaginalis* após o tratamento com 10 µM de LDT117 (**c – c'**) e 10 µM de LDT134 (**d –**
2138 **d'**) por 24 h. Nota-se resultado positivo para fragmentação do DNA (**b`-d`**).

2139

2140 **5.14. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

2141 Para verificar os possíveis efeitos provocados pelos compostos LDT117
2142 e LDT134 na ultraestrutura dos parasitos utilizamos a microscopia eletrônica de
2143 varredura. A figura 38a mostra a forma geral das células livres não tratadas,
2144 com as *T. vaginalis* em morfologia habitual, piroforme, com quatro flagelos
2145 anteriores e um flagelo recorrente. Parasitas incubados com o composto
2146 LDT117 apresentaram-se agregados. Notamos a presença de vesículas
2147 semelhantes a *blebs* de membrana e células arredondadas e disformes (Fig.
2148 38b-f).

2149 Os parasitas incubados na presença do composto LDT134
2150 apresentaram células arredondadas e deformadas (Fig. 39a-f), protusões
2151 celulares e drásticas alterações na superfície celular (Fig. 39b-f).

2152

2153

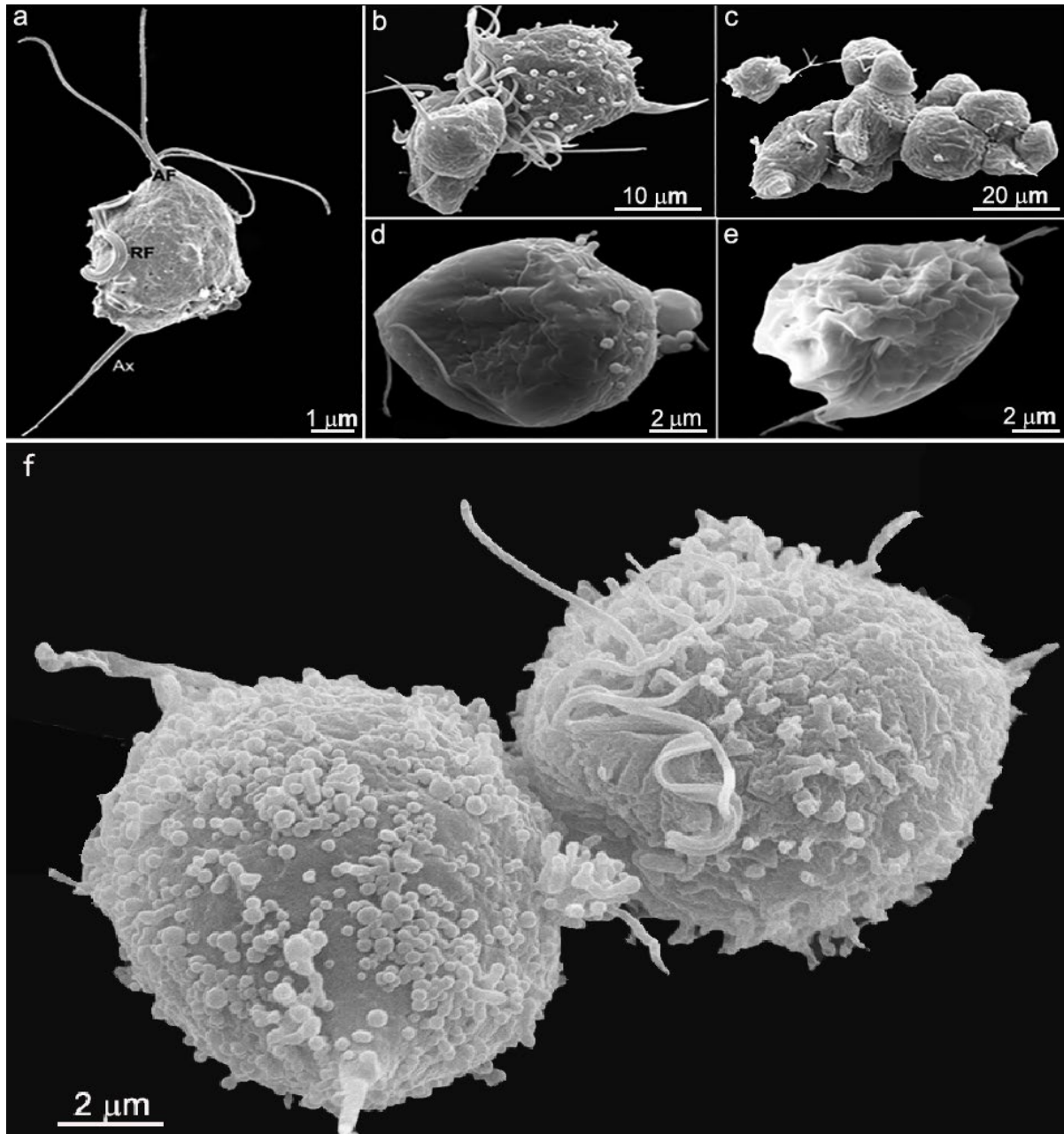


Figura 38. MEV de *T. vaginalis*. Controle (a) e expostos ao composto LDT117 na concentração de 10 μ M por 24h (b-f). Notam-se células com vesículas semelhantes a *blebs* de membrana (b e f), agregados celulares (c), células disformes (d-e) e início da formação de pseudocistos (f).

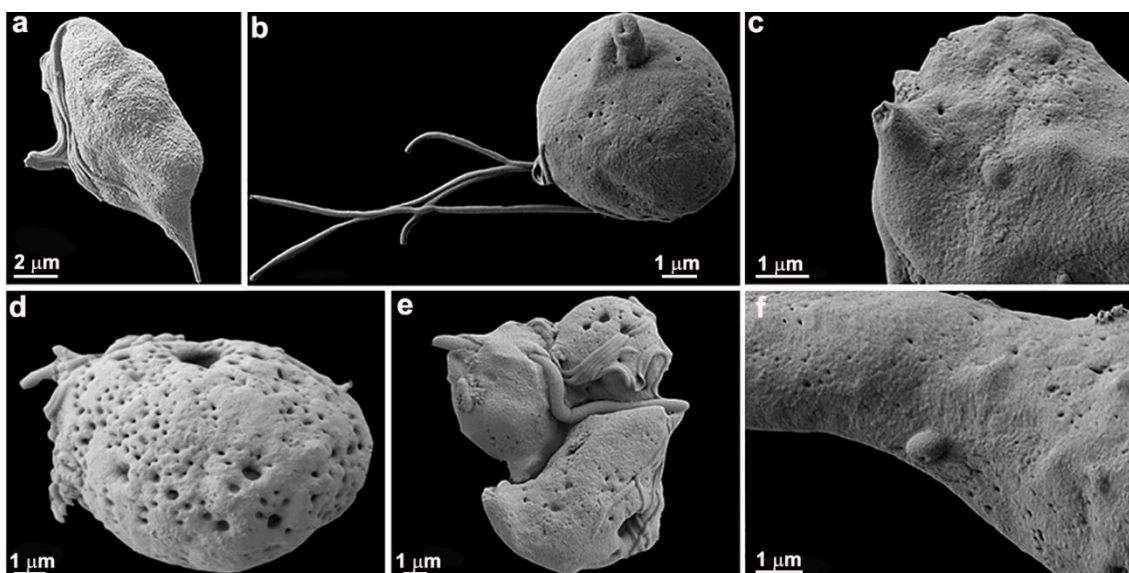


Figura 39. MEV de *T. vaginalis* controle (a) e expostos ao composto LDT134 na concentração de 10 µM por 24h (b-f) Observam-se as protusões na superfície celular, células disformes e alterações membranares (b-f).

5.15. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para verificar os possíveis efeitos provocados pelos compostos na ultraestrutura dos parasitos, foram realizados processamentos para microscopia eletrônica de transmissão. A figura 40a mostra uma imagem de MET de uma célula controle, onde *T. vaginalis* apresenta morfologia típica. Células tratadas com LDT117 apresentaram alterações, com membranas enrugadas (Fig. 40b), projeções da membrana plasmática e formação de perfis de membrana sugestivos de serem eliminados pela célula. Além disso, encontramos estruturas semelhantes a figuras mielínicas (Fig. 40c), vacúolos aumentados (Fig. 40d) e alterações nas cisternas do Golgi. Após o tratamento com LDT134 a análise por MET mostrou as células com vesículas semelhantes a *blebs* de membrana (Fig. 41b), vacuolização citoplasmática e presença de figuras mielínicas (Fig. 41c-d). Na figura 42 observamos alterações da superfície celular apresentando membranas enrugadas (Fig. 42a-d), retração citoplasmática (Fig. 42b), projeções membranares (Fig. 42 b-c) e vacúolos aumentados (Fig. 42e).

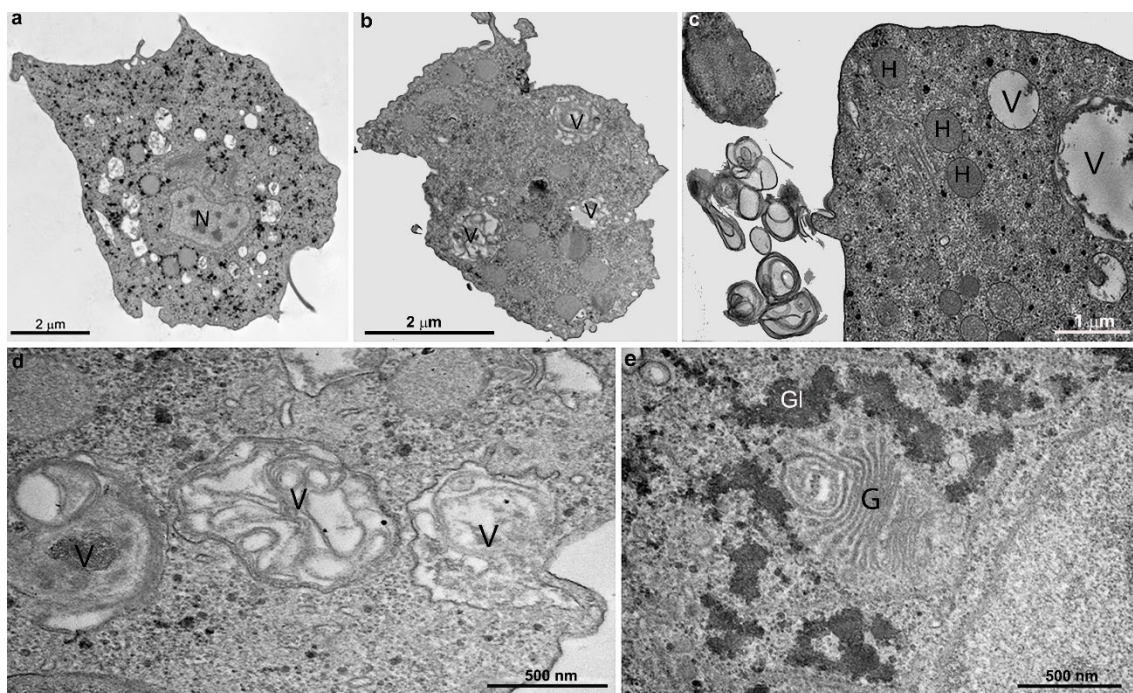


Figura 40. MET de *T. vaginalis* tratadas com 10 μ M de LDT117 por 24 h. (a) Controle e tratadas (b-c-d-e) com 10 μ M de LDT117. Notam-se alterações da superfície celular (membrana plasmática enrugada, seta) (b). Intensa formação de perfis de membrana sugestivos de extrusão pela célula (setas) (c), grandes vacúolos (d) e alterações nas cisternas do Golgi (e). N, núcleo; H, hidrogenossomos; V, vacúolos; G, Golgi; Gl, grânulos de glicogênio.

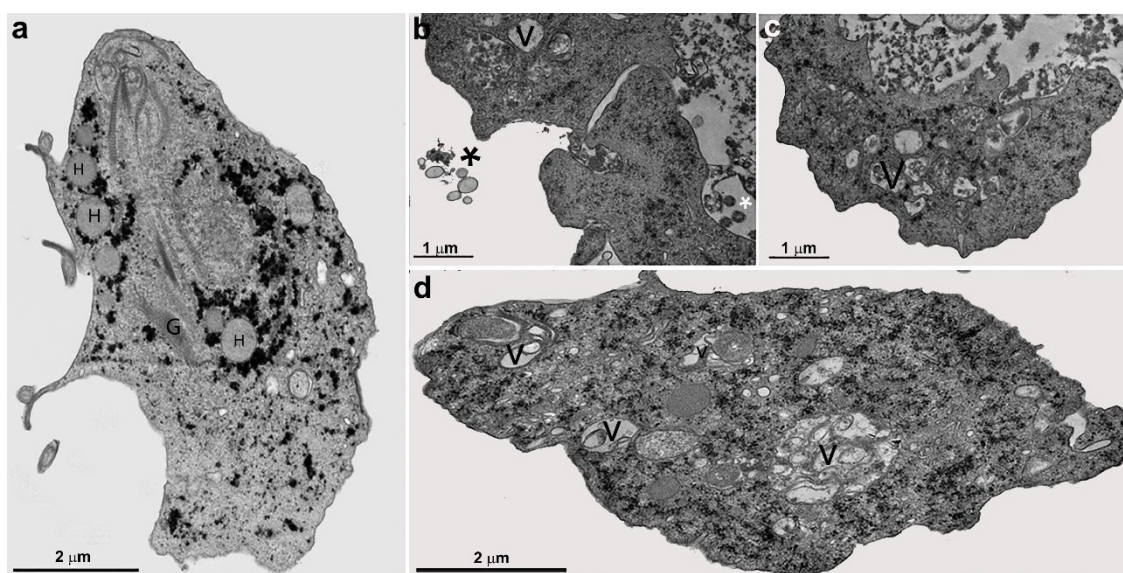


Figura 41. MET de *T. vaginalis* controle (a) e tratadas com 10 μ M de LDT134 por 24 h (b-c-d-e). Nota-se a presença de vesículas semelhantes a *blebs* de membrana (asterisco) (b), vacuolização citoplasmática e presença de figuras mielínicas (b-c-d). N, núcleo; H, hidrogenossomos; V, vacúolos; G, Golgi.

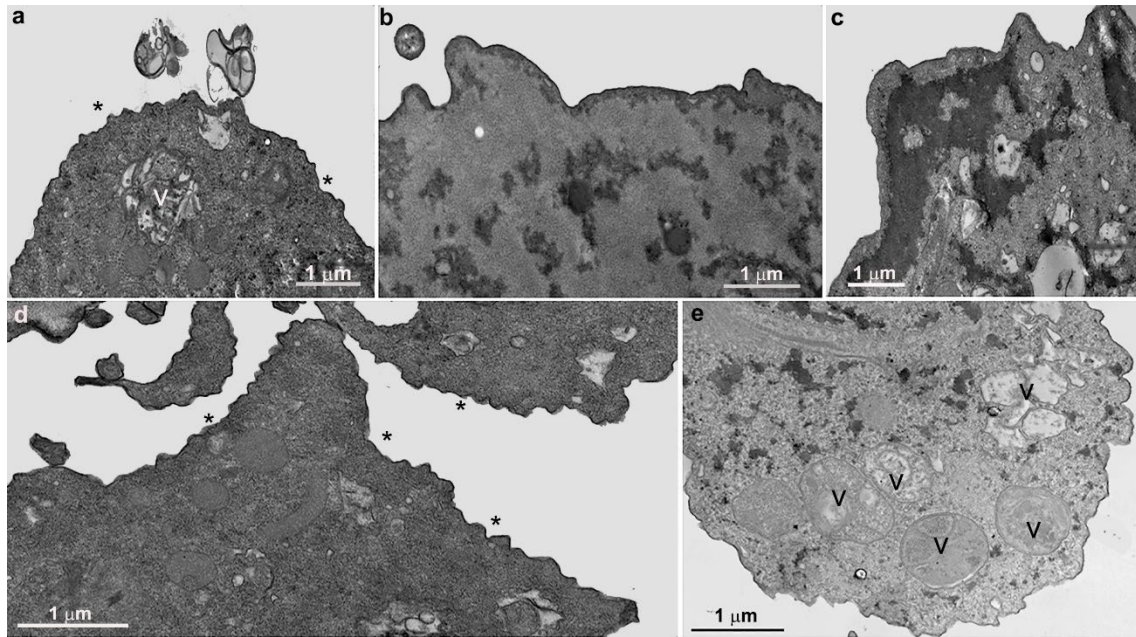


Figura 42. MET de *T. vaginalis* tratadas com 10 μ M de LDT134 por 24 h. Controle (a) e tratadas (b-c-d-e) com 10 μ M de LDT134. Observamos alterações de superfície celular, membrana plasmática enrugada (asteriscos em d) (a-d), retração citoplasmática (b), projeções membranares (b-c) e vacúolos (V) aumentados (e).

6. Discussão

6.1. Amiodarona, amioder e dronedarona

O metronidazol é o principal medicamento atualmente utilizado no tratamento da tricomoniase e de outras infecções parasitárias causadas por microrganismos anaeróbios. Embora eficaz, apresenta vários problemas, como apontado na introdução. Portanto, vários grupos empreenderam estudos para identificar novos compostos ativos e menos tóxicos e novos alvos celulares de medicamentos contra tricomonas e outros parasitas. Os exemplos incluem (a) azasteróis que inibem a esterol metiltransferase envolvida na via de biossíntese de esterol (ROSA *et al.*, 2011), (b) hidroxiquinuclidina, que inibe a esqualeno sintase (ROCHA *et al.*, 2014), (c) amiodarona e seus derivados (amioder e dronedarona) que induzem um grande aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular (BENAIM *et al.* 2021). Estudos em outros protozoários, especialmente em *T. cruzi* e *Leishmania*, indicam que esses compostos perturbam a homeostase intracelular de Ca^{2+} e podem matar os parasitas com pouca interferência nas células hospedeiras. Sabe-se que o Ca^{2+} desempenha um papel fundamental em importantes processos de sinalização em células eucarióticas, sendo que a regulação de Ca^{2+} em parasitas difere do que acontece nas células de mamíferos (BENAIM *et al.*, 2020). Nesse contexto, a amiodarona, comumente utilizada como medicamento antiarrítmico em humanos, induziu efeitos sobre *T. cruzi* (ADESSE *et al.*, 2011; BENAIM *et al.*, 2006, 2021; SASS *et al.*, 2019; VEIGA-SANTOS *et al.*, 2012) e *Leishmania* (BENAIM *et al.*, 2014; MARTINEZ-SOTILLO *et al.*, 2019; SERRANO-MARTÍN *et al.*, 2009a, b), principalmente devido à interrupção da homeostase do cálcio, além de inibir a atividade da oxidosqualeno ciclase, uma enzima chave na via de síntese do ergosterol que é essencial para a sobrevivência dos tripanossomatídeos (BENAIM *et al.*, 2021). Outros compostos relacionados com a amiodarona, tais como a dronedarona e amioder, também apresentaram atividade sobre *T. cruzi* e *L. mexicana*, pelos mesmos mecanismos, mas, curiosamente, a dronedarona foi mais potente na leishmaniose do que a amiodarona, pois foi capaz de colapsar o potencial da membrana mitocondrial

e induzir uma alcalinização dos acidocalcisomos mais rapidamente quando comparada com a amiodarona (BENAIM *et al.*, 2021).

Nossas observações mostraram que a amiodarona na concentração de 10 µM, anteriormente usada em *T. cruzi* e que inibiu significativamente o crescimento desse parasita (ADESSE *et al.*, 2011; BENAIM *et al.*, 2006, 2012; SASS *et al.*, 2019; VEIGA-SANTOS *et al.*, 2012) e *Leishmania* (BENAIM *et al.*, 2014; MARTINEZ-SOTILLO *et al.*, 2019; SERRANO-MARTÍN *et al.*, 2009a, b), não apresentou efeito no crescimento de *T. vaginalis*. Em contraste, estimulou o crescimento e adesão do parasita, formando grandes agregados celulares. De fato, a microscopia de imunofluorescência de células marcadas com DAPI mostrou grandes células multinucleadas de *T. vaginalis* tratadas com amiodarona. A imunomarcção para tubulina também revelou a presença de múltiplas estruturas do citoesqueleto. A análise por citometria de fluxo revelou muitas células na fase G2/M do ciclo celular. Assim, estas observações indicaram que a amiodarona estimulou a divisão celular, mas com bloqueio da citocinese, levando ao aparecimento de células multinucleadas. Este composto também induziu intensa agregação celular com o aparecimento de grandes massas contendo células aderidas entre si, até mesmo parecendo uma estrutura semelhante a um tecido. Outro significativo efeito da amiodarona foi o aumento do citoplasma e estruturas densas, identificadas como partículas de glicogênio usando o método citoquímico de Thiéry, seguido de incubação com tiosemicarbazida e proteinato de prata, classicamente utilizada para identificar carboidratos (Thiéry 1967), indicando a interferência da droga no metabolismo celular. A análise por microscopia eletrônica também indicou alterações na estrutura dos hidrogenossomos. Estes incluem localização periférica e exibição em forma alongada em comparação com a forma arredondada encontrada em células não tratadas. É importante ressaltar que as *Trichomonas* não apresentam mitocôndrias. Estudos anteriores mostraram que a amiodarona e seus derivados têm como alvo as mitocôndrias, levando ao colapso do potencial eletroquímico da membrana do parasita, não afetando a célula hospedeira e induzindo uma rápida liberação de Ca²⁺ para o citoplasma (BENAIM *et al.* 2006). Em outros parasitas, a amiodarona também afeta os acidocalcisomos, provocando a sua alcalinização, simultaneamente à liberação

de Ca^{2+} (BENAIM *et al.*, 2020). *T. vaginalis* é uma célula amitocondrial onde os hidrogenossomos são responsáveis pelo metabolismo energético e acumulam Ca^{2+} , especialmente em sua vesícula periférica (BENCHIMOL 2008). Não encontramos nenhuma informação sobre a regulação intracelular de Ca^{2+} em *T. vaginalis*. No entanto, nem as mitocôndrias nem os acidocalcisomos, característicos dos tripanosomatídeos e envolvidos na homeostase do Ca^{2+} e na bioenergética dos cinetoplastídeos, estão presentes em *Trichomonas* (DO CAMPO e MORENO 2003). O hidrogenossomo tem sido considerado um alvo importante para medicamentos (LAND *et al.* 2001; WRIGHT *et al.* 2010; ROSA *et al.*, 2011; BENCHIMOL *et al.*, 2022; DE SOUZA *et al.*, 2023). Nossa presente observação sugere que em *T. vaginalis*, a amiodarona pode ter múltiplos efeitos. Nossos resultados mostram que o amioder e a dronedarona inibiram o crescimento do parasito em dose-dependente com IC_{50} de 3,15 e 11 μM , respectivamente (DE SOUZA *et al.*, 2022). Esses valores, especialmente para amioder, são relativamente baixos e apontam para este grupo químico como potencial interesse na quimioterapia contra a tricomoníase. É importante ressaltar que o IC_{50} do metronidazol, medicamento atualmente utilizado, encontra-se na faixa de 2 μM . Amioder é um derivado do benzofurano baseado na estrutura da amiodarona. Estudos recentes mostraram que este composto pode apresentar efeito contra epimastigotas e amastigotas que se multiplicam nas células hospedeiras (PINTO MARTINEZ *et al.*, 2018). Nessas células testadas, amioder apresentou mecanismo de ação semelhante ao da amiodarona causando, além do aumento de Ca^{2+} e do colapso do potencial eletroquímico da membrana mitocondrial, a alcalinização dos acidocalcisomas do parasita. Um efeito semelhante foi encontrado para amioder em *L. donovani* (MARTINEZ-SOTILLO *et al.*, 2019). Dronedarona foi sintetizada para atenuar os efeitos colaterais de amiodarona. Experimentos *in vitro* contra *T. cruzi* mostraram que a dronedarona parece ser mais eficaz do que a amiodar (BENAIM *et al.*, 2012; BENAIM e PANIZ-MONDOLF 2012). No *T. cruzi*, a dronedarona provocou efeito nas mitocôndrias e nos acidocalcisomos, no entanto, esse efeito foi mais rápido do que com amiodarona, e como vantagem ter um IC_{50} menor (0,75 μM) quando comparado à amiodarona (IC_{50} 2,7 μM) em amastigotas dentro de células hospedeiras de mamíferos (BENAIM *et al.*, 2012; BENAIM e PANIZ-MONDOLF 2012). Tanto a amiodarona quanto a

dronedarona foram eficazes contra *L. mexicana*, agente causador da leishmaniose cutânea, demonstrando um IC₅₀ muito baixo em amastigotas dentro de macrófagos (SERRANO-MARTÍN *et al.*, 2009a, b), especialmente no caso da dronedarona onde foi relatado um IC₅₀ de 0,65 nM (BENAIM *et al.*, 2014). No presente estudo, além dos efeitos antiproliferativos de amioder e dronedarona, esses compostos também causaram alterações morfológicas em *T. vaginalis*, como deformações e células agregadas e alterações nos hidrogenossomos. Análises realizadas por microscopia de fluorescência apresentaram marcação positiva para o ensaio TUNEL, indicando morte celular por apoptose quando as células foram tratadas com amioder e dronedarona (DE SOUZA *et al.*, 2022). Juntas, essas observações indicam que os compostos utilizados neste trabalho podem ser considerados promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos, o que justifica futuramente os testes de infecção *in vivo* em modelos animais, visando estratégias alternativas de quimioterapia para doenças causadas por protozoários anaeróbios, como a *T. vaginalis*.

6.2. SQ109

Nossos resultados indicam que o SQ109 inibe o crescimento de *T. vaginalis* em baixa concentração e induz a alterações morfológicas que levam o parasita à morte. Essas mudanças incluem um aumento do volume dos hidrogenossomos, como mostrado pelas análises morfométricas e a inibição do potencial de membrana hidrogenossomal, conforme avaliado pelo corante JC-1. Estes dados sugerem que o hidrogenossomo é um alvo potencial para SQ109 em *T. vaginalis* (DE SOUZA *et al.*, 2023). Além disso, a análise de *docking molecular* indicou a ferredoxina, que realiza o transporte de elétrons, resultando na produção de moléculas de hidrogênio (revisão em KULDA, 1999), como um alvo potencial para SQ109 e com maior afinidade pela ferredoxina do que o metronidazol (DE SOUZA *et al.*, 2023). É importante salientar que o DMSO não afetou o crescimento do parasita na concentração usada para diluir os compostos (DE SOUZA *et al.*, 2023). Estudos anteriores mostraram maior atividade contra *T. cruzi*, com IC₅₀ de 0,5 e 4,6 µM

observados para amastigotas e epimastigotas, respectivamente (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2015). No caso de amastigotas intracelulares de *Leishmania donovani*, foi encontrado um IC₅₀ de 11 nM (GIL *et al.*, 2020). Estudos sobre *Mycobacterium tuberculosis* mostraram atividade inibitória com IC₅₀ de 26 µM (PROTOPOPOVA *et al.*, 2005). Além disso, o teste citotóxico que detecta a hemólise de glóbulos vermelhos aponta para um EC₅₀ superior a 80 µM (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2015) e CC₅₀ de 2,5 µM usando células LLCMK2 (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2015). Esses valores apontam para um potencial significativo para usar o composto SQ109 como agente quimioterápico. Além disso, é importante salientar que o SQ109 é um medicamento candidato antitubercular que tem está em Fase Clínica IIb/III (BAEK *et al.*, 2022).

O JC-1 é uma sonda fluorescente lipofílica e catiônica para determinar o potencial de membrana mitocondrial (REERS *et al.*, 1991). Trabalhos anteriores relataram que células com mitocôndrias saudáveis tratadas com o JC-1 aparecem em vermelho, enquanto uma fluorescência verde é vista nas mitocôndrias incapacitadas (REERS *et al.*, 1991). Como os hidrogenossomos compartilham várias semelhanças com as mitocôndrias, o JC-1 mostrou um padrão de marcação nos hidrogenossomos semelhantes aos observados por outros autores em mitocôndrias (VILELA *et al.*, 2010). No presente estudo, os hidrogenossomos funcionais se apresentaram marcados em vermelho. Em contraste, foram observados hidrogenossomos maiores e marcados em verde após o tratamento com SQ109, indicando uma perda do potencial de membrana do hidrogenossomo. O CCCP (cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona), um desregulador do potencial da membrana mitocondrial, foi usado como controle positivo para confirmar o resultado apresentado pelo JC-1. Mais estudos bioquímicos são necessários para obter algumas informações sobre esse efeito.

A microscopia eletrônica de varredura mostrou que *T. vaginalis* tratadas com SQ109 apresentava uma forma arredondada, em contraste com os característicos parasitas controle em forma de pera (*T. vaginalis*). Além disso, os parasitas tratados com medicamentos apresentaram alterações na superfície celular que se apresentava com muito mais saliências. A análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelou um aumento significativo

no número e tamanho dos hidrogenossomos nas células tratadas com SQ109. Para verificar esta observação, realizamos análises morfométricas utilizando uma amostra estatisticamente significativa onde pelo menos vinte células foram examinadas em células controle e tratadas com o composto. Como resultado, o diâmetro médio dos hidrogenossomos das células controle foi de 400 nm enquanto nas tratadas o diâmetro médio encontrado foi quase o dobro, de 700 nm, indicando um aumento significativo no tamanho da organela. Além disso, em relação à área ocupada na célula pelos hidrogenossomos, observamos valores médios de 0,5 e 1,5 μm^2 para células controle e tratadas, respectivamente. No que diz respeito ao volume ocupado pelos hidrogenossomos, obtivemos valores médios de 2,6 μm^3 (células controle) e 4,4 μm^3 (células tratadas). Porém, em estudos anteriores de *T. vaginalis* tratados com metronidazol, a principal alteração observada foi a redução no tamanho dos hidrogenossomos (LAND *et al.*, 2001; WRIGHT *et al.*, 2010). A redução do tamanho dos hidrogenossomos, teria relação com a resistência anaeróbica e estaria associada à regulação negativa de enzimas hidrogenossomais envolvidas na ativação do metronidazol, como a piruvato-ferredoxina oxidoreductase (PFOR) e a ferredoxina (WRIGHT *et al.*, 2010; LAND *et al.*, 2001; UPCROFT, 2001), sendo que estes dados sugerem que a expressão genética alterada de múltiplas proteínas hidrogenossomais resultaria na modificação da organela. No entanto, cepas de *T. vaginalis* resistentes clinicamente ao metronidazol mostraram que os hidrogenossomos apresentavam tamanhos semelhantes ao de um isolado sensível ao metronidazol (WRIGHT *et al.*, 2010). Os hidrogenossomos se dividem por fissão, de modo semelhante às bactérias (BENCHIMOL *et al.*, 1996). Podemos especular que a organela afetada pelo composto poderia apresentar interrupção no seu mecanismo de organela-cinese e assim seu volume dobraria de tamanho. Alternativamente, a organela aumentaria seu volume como um mecanismo compensatório para tentar exercer suas funções comprometidas pelo efeito da droga. Juntas, estas observações apontam para uma resposta significativa das organelas ao composto SQ109. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou que a superfície do hidrogenossomo apresentava-se pequenas partículas densas na sua proximidade. Essas partículas foram identificadas como partículas de β -glicogênio, pois sua

densidade aumentou quando as seções foram incubadas sequencialmente na presença de ácido periódico, tiosemicarbazida e proteinato de prata (BENCHIMOL e BERNARDINO, 2002). Embora as alterações morfológicas induzidas pelo SQ109 sejam muito claras em *T. vaginalis*, elas não indicam o seu mecanismo de ação. Estudos realizados com *Mycobacteria tuberculosis* fornecem evidências de que ele tem como alvo a proteína de membrana Large 3 (MmpL3) e dissipa o gradiente eletroquímico de prótons transmembrana necessário para a biossíntese da parede celular e a atividade bacteriana (ZHANG *et al.*, 2019). Também interfere nos transportadores lipídicos e na extrusão de medicamentos das bactérias (ZHANG *et al.*, 2019). Em tripanossomatídeos, o SQ109 interfere na captação de Ca^{2+} pelos acidocalcisomos (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2015) e colapsa o potencial eletroquímico mitocondrial nesses parasitas (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2016; GIL *et al.*, 2020; VEIGA-SANTOS *et al.*, 2015). Esses dois efeitos sobre essas organelas, que estão envolvidas na bioenergética e na homeostase do Ca^{2+} nos tripanossomatídeos, são acompanhados por um grande aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , postulada como uma das principais causas de morte parasitária (BENAIM *et al.*, 2020).

Dadas as análises bioinformáticas preliminares prevendo a proteína ferredoxina de *T. vaginalis* (TvFd) como um alvo potencial para SQ109 e metronidazol, decidimos realizar análises adicionais usando simulação de acoplamento molecular. Foi realizado um processo de *redocking* entre o a proteína cristalizada e seu ligante natural, o complexo [2Fe–2S], para determinar os resíduos de interação e assim identificar a posição e o tamanho da caixa da grade, bem como verificar a energia de afinidade entre as moléculas e finalmente comparar estes resultados com os da simulação de acoplamento entre TvFd e os compostos SQ109 e MTZ. Os resultados de *redocking* mostraram que a menor energia de interação do TvFd e [2Fe–2S] foi – 2,0 kcal/mol e sabe-se que interage com Phe23, Asp36, Thr37, Cys38, Gln39, Asn41, Lys42, Cys44, Lys46, Cys47, Phe66, Cys78, Leu76 (CROSSNOE *et al.*, 2002). Em seguida, foi realizada a simulação de acoplamento entre o cristal TvFd e os compostos MTZ e SQ109, realizado com os mesmos parâmetros usados para o ligante natural. A energia de interação do MTZ com TvFd foi de -3,8 kcal/mol (em sua melhor posição). Os resíduos

que participaram da interação foram Met32 Lys46 Ile48 e Leu93. Já a energia de interação do composto SQ109 com TvFd foi -4,6 kcal/mol (em sua melhor pose) e o aminoácidos foram Phe23, Thr27, Met32, Ser33, Ala34, Asp35, Asp36, Thr37, Cys38, Gln39, Gly40, Asn41, Lys42, Ala43, Cys44, Gly45, Lys46, Cys47, Ile48, Leu76, Cys78. Estes resultados indicaram que os compostos MTZ e SQ109 apresentam maior afinidade para os resíduos no sítio ativo do TvFd, onde o complexo [2Fe-2S] liga-se naturalmente. O MTZ, mesmo com a determinação da grid box, não permanece no mesmo local que o complexo [2Fe2S], não competindo pelos mesmos resíduos, tendo apenas um aminoácido em comum (Lys46). Por outro lado, o composto SQ109 apresenta maior afinidade por TvFd do que os outros dois ligantes, interagindo com a proteína com um maior número de aminoácidos, competindo por 11 dos 13 aminoácidos com o qual o complexo [2Fe-2S] interage. Como os dois compostos não competiram pelos mesmos resíduos, é possível que a associação de ambos possa ter efeitos aditivos, necessitando assim de mais estudos. Nossas observações identificam o SQ109 como um composto promissor contra *T. vaginalis in vitro*. Dessa forma, sugere-se futuramente os testes de infecção *in vivo* em modelos animais e sua utilidade potencial como quimioterapia alternativa para tricomoniase.

6.3. APL LDT 117 e LDT134

Um alvo importante dos compostos APL LDT 117 e LDT134 seria a biossíntese de fosfolipídios, dado o papel desempenhado por essas moléculas na estrutura e funções do metabolismo celular, tornando-os adequados como alvo para medicamentos com ampla atividade biológica (DE SOUZA *et al.*, 2018). Os análogos de alquilfosfolipídios (APL) foram inicialmente desenvolvidos como agentes antitumorais (GAJATE E MOLLINEDO, 2002). Inclusive, a miltefosina (MLT) que é uma alquilfosfocolina, foi introduzida na clínica para tratar a leishmaniose visceral tendo sido, pela primeira vez, aprovada para este uso na Índia (JHA *et al.* 1999). Atualmente, a miltefosina é utilizada em pacientes por via oral e desde então tem sido uma molécula protótipo para o desenvolvimento de novos análogos de fosfolipídeos. Foi

demonstrado que os análogos de fosfolipídios apresentaram atividades antiparasitárias, induzindo a morte celular por meio de apoptose e/ou autofagia em parasitas como *Leishmania*, *T. cruzi* e *T. vaginalis* (GODINHO *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2018; BARRIAS *et al.*, 2019; CHAZAPI *et al.*, 2021; MAGOULAS *et al.*, 2021). Em tripanosomatídeos após tratamentos com APL, foi descrito que esses compostos induziram alterações na membrana plasmática, mitocôndrias, complexo de Golgi, estrutura flagelar e apresentaram vacúolos autofágicos e lipídicos (GODINHO *et al.*, 2013; BARRIAS *et al.*, 2019; MAGOULAS *et al.*, 2021). Além do mais, foi observado um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) bem como alterações no potencial de membrana (GODINHO *et al.*, 2013; BARRIAS *et al.*, 2019; MAGOULAS *et al.*, 2021). Um estudo conduzido por Godinho e colaboradores (2013) de uma molécula híbrida alquilfosfocolina-dinitroanilina mostrou que TC95 foi eficaz contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. *Ensaio*. Ensaio antiproliferativo indicaram que o TC95 é um potente inibidor de promastigotas e amastigotas intracelulares com valores de IC₅₀ de 2,6 e 1,2 µM, respectivamente. Estudos usando miltefosina (MLT) (ROCHA *et al.*, 2014), azasteróis (ROSA *et al.*, 2011), e hidroxiquinuclidina (ROCHA *et al.*, 2014) em *T. vaginalis*, também demonstraram diversas alterações nesses parasitas, como células enrugadas e arredondadas, formação de pseudocistos; figuras semelhantes a mielina, formação de *blebs* na membrana, vacuolização intensa e condensação da cromatina, todas indicativas de morte celular por apoptose. Além do mais, células tratadas com o IC₅₀ de MLT reduziram significativamente o número de parasitas viáveis (revisado por BENCHIMOL *et al.*, 2022).

Nossos resultados indicaram que os alquilfosfolipídios LDT117 e LDT134 apresentaram atividade antiparasitária com IC₅₀ de 4,48 e 5,67 µM respectivamente, não sendo citotóxico para as células epiteliais LLCMK-2, tornando os compostos importantes por não afetar células humanas futuramente. Observações por MEV e MET demonstraram que *T. vaginalis* tratadas com LDT117 e LDT134 apresentaram alterações morfológicas tais como células agregadas, arredondadas e disformes. Além disso, vesículas semelhantes a *blebs* de membrana, protrusões celulares, intensa vacuolização,

vacúolos autofágicos, figuras mielínicas e drásticas alterações nas membranas foram observadas. É importante salientar que muitas dessas alterações já foram demonstradas em *T. vaginalis* tratadas com peróxido de hidrogênio (MARIANTE *et al.*, 2003), taxol (MADEIRO DA COSTA e BENCHIMOL, 2004), nocodazol (MADEIRO DA COSTA e BENCHIMOL, 2004), griseofulvina (MARIANTE *et al.*, 2006), jasmonato de metila (VILELA *et al.*, 2010), complexos zinco-clotrimazol (MIDDLEJ *et al.*, 2019), tiossemicarbazonas (IBÁÑEZ-ESCRIBANO *et al.*, 2022), amiodarona, amioder e dronedarona (DE SOUZA *et al.*, 2022) e SQ109 (DE SOUZA *et al.*, 2023) entre outros. É importante notar que os fenômenos descritos acima, como formação de *blebs* na membrana, vacuolização e autofagia, são características típicas de morte celular e foram descritos anteriormente em tricomonas (MARIANTE *et al.*, 2006; BENCHIMOL *et al.*, 2008; BENCHIMOL *et al.*, 2022). Além disso, a presença de vacúolos autofágicos sugere que as células tentaram uma estratégia de sobrevivência, provavelmente reciclagem da membrana plasmática, sob condições de estresse (EDINGER E THOMPSON, 2004; HERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2019; MAIA *et al.*, 2007). No entanto, no presente estudo nenhuma alteração foi observada nas formas endoflagelares (pseudocistos). Essas formas de tricomonas com os flagelos internalizados aparecem em condições ambientais desfavoráveis como falta de nutrientes ou estresse por drogas (PEREIRA-NEVES *et al.*, 2003). Análises realizadas por microscopia de fluorescência apresentaram marcação positiva para o ensaio do TUNEL após o tratamento com LDT117 e LDT134, indicando a morte celular desses parasitas por apoptose. Juntos estes resultados sugerem que os alquilfosfolípidios podem ser compostos importantes no desenvolvimento de novas abordagens quimioterapêuticas contra *T. vaginalis*, sendo necessário futuramente realizar testes de infecção *in vivo* em modelos animais.

7. Conclusões

- A amiodarona, droga antiarrítmica, estimulou o crescimento do parasita, induziu a agregação celular e o acúmulo de glicogênio.
- Após o tratamento com amiodarona o ciclo celular do parasita foi alterado, mais especificamente na fase G2/M e células multinucleadas foram observadas indicando que a citocinese pode estar bloqueada nesses parasitas.
- Os compostos amioder e dronedarona inibiram o crescimento do parasita com IC₅₀ de 3,15 e 11 µM, respectivamente.
- As células tratadas com os compostos amiodarona, amioder e dronedarona exibiram alterações morfológicas, incluindo um efeito na estrutura dos hidrogenossomos.
- Após tratamento com amioder e dronedarona, observou-se morte dos parasitas em um processo semelhante a apoptose.
- SQ109, candidato a medicamento antitubercular, inibiu o crescimento de *T.vaginalis* com um IC₅₀ de 3,15 µM.
- SQ109 induziu alterações morfológicas tais como aumento do volume de hidrogenossomos, conforme mostrado por análises morfométricas.
- SQ109 inibiu o potencial de membrana dos hidrogenossomos, conforme avaliado por JC-1.

- 2565 • A análise de acoplamento molecular aponta para a ferredoxina, como
2566 um alvo potencial para o SQ109, e com maior afinidade à ferredoxina do
2567 que o apresentado pelo metronidazol.
- 2568
- 2569
- 2570 • LDT117 e LDT134 apresentaram atividade antiparasitária com IC₅₀ de
2571 4,48 e 5,67 µM, respectivamente.
- 2572
- 2573 • LDT117 e LDT134 não foi citotóxico para as células epiteliais LLCMK-2,
2574 sugerindo a seletividade da droga e utilidade ao não afetar células de
2575 mamíferos.
- 2576 .
- 2577
- 2578 • Observações por MEV revelaram alterações na superfície celular com a
2579 presença de *blebs* de membrana e protrusões após o tratamento com os
2580 compostos LDT117 e LDT134.
- 2581
- 2582 • A análise por MET mostrou a presença de vacúolos autofágicos, figuras
2583 mielínicas e vacuolização no citoplasma após incubação com os
2584 compostos LDT117 e LDT134.
- 2585
- 2586 • Após o tratamento com LDT117 e LDT134 observou-se morte dos
2587 parasitas por um processo semelhante a apoptose
- 2588
- 2589
- 2590 • Os compostos utilizados no presente estudo mostraram-se promissores
2591 e poderiam servir como quimioterapia alternativa para o tratamento da
2592 tricomoníase. Dessa forma, sugere-se futuramente a necessidade de
2593 estudos *in vivo* em modelos animais, com foco nos efeitos
2594 quimioterápicos.
- 2595

2596 8. Referências Bibliográficas

- 2597 ADESSE, D., AZZAM, EM., MEIRELLES, MDE, N., URBINA, JA., GARZONI,
2598 LR. Amiodarone inhibits *Trypanosoma cruzi* infection and promotes cardiac cell
2599 recovery with gap junction and cytoskeleton reassembly in vitro. **Antimicrobial**
2600 **Agents and Chemotherapy**, 55,203-10, 2011. doi: 10.1128/AAC.01129-10.
- 2601 ADDIS, M.F., RAPPELLI, P., FIORI, P.L. Host and tissue specificity of
2602 *Trichomonas vaginalis* is not mediated by its known adhesion proteins.
2603 **Infection and Immunity**, 68, 4358- 4360, 2000. doi: 10.1128/IAI.68.7.4358-
2604 4360.2000.
- 2605 AFFONSO, A.L., BENCHIMOL, M., RIBEIRO, K.C., LINS, U., DE SOUZA, W.
2606 Further studies on the endocytic activity of *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology**
2607 **Research**, 80, 403-413,1994. doi: 10.1007/BF00932378.
- 2608 AFFONSO, A.L., DE ALMEIDA, J.C., BENCHIMOL, M. Partial characterization
2609 of cytoplasmic compartments involved in the endocytic process of
2610 *Tritrichomonas foetus*. **European Journal of Cell Biology**, 72, 247-256, 1997.
- 2611 AKBARI, Z., MATINI, M. The study of trichomoniasis in pregnant women
2612 attending Hamadan City Health Centers in 2015.**Clinical Microbiology and**
2613 **Infection**, 4, 41-533, 2017. <https://doi.org/10.5812/ajcmi.41533>.
- 2614 ALDERETE, J.F., GARZA, J. E. Identification and properties of *Trichomonas*
2615 *vaginalis* proteins involved in cytoadherence. **Infection and Immunity**, 56, 28-
2616 33, 1998. doi: 10.1128/iai.56.1.28-33.1988.
- 2617
2618 ANDRADE, J. Microvesículas e Nanotubos de Tunelamento em *Trichomonas*
2619 *vaginalis* em cultivo axênico e durante interação com células vaginais.
2620 Dissertação (Mestre em Ciências Biomédicas). Programa de pós-graduação
2621 em Biomedicina Translacional (UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO) p.73.2022.
- 2622
2623 ARAUJO-SILVA, C.A., DE SOUZA, W., MARTINS-DUARTE, E.S., VOMMARO,
2624 R.C. HDAC inhibitors Tubastatin A and SAHA affect parasite cell division and
2625 are potential anti-*Toxoplasma gondii* chemotherapeutics. **International Journal**
2626 **for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 15, 25-35, 2020. doi:
2627 10.1016/j.ijpddr.2020.12.003.
- 2628
2629 ARROYO, R., ALDERETE. J.F. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase
2630 activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. **Infection and**
2631 **Immunity**, 57, 2991-2997, 1989. doi: 10.1128/iai.57.10.2991-2997.
- 2632

2633 ARROYO, R., ALDERETE, J.F. Molecular bases of host epithelial cell
 2634 recognition by *Trichomonas vaginalis*. **Molecular Microbiology**, 6, 853-862,
 2635 1992. doi: 10.1111/j.1365-2958. 1992.tb01536. x.

2636 ARROYO, R., GONZÁLEZ-ROBLES, A., MARTÍNEZ-PALOMO, A.,
 2637 ALDERETE, J.F. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid
 2638 transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. **Molecular**
 2639 **Microbiology**, 7, 299-309, 1993. doi: 10.1111/j.1365-2958. 1993.tb01121. x.

2640 ARTUYANTS, A., CAMPOS, TL., RAI, AK., JOHNSON, PJ., DAUROS-
 2641 SINGORENKO, P., PHILLIPS, A., SIMOES-BARBOSA, A. Extracellular
 2642 vesicles produced by the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis* contain a
 2643 preferential cargo of tRNA-derived small RNAs. **International Journal for**
 2644 **Parasitology**, 50, 1145-1155, 2020. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.07.003.

2645 ARTUYANTS, A., HONG, J., DAUROS-SINGORENKO, P., PHILLIPS, A.,
 2646 SIMOES-BARBOSA, A. *Lactobacillus gasseri* and *Gardnerella vaginalis*
 2647 produce extracellular vesicles that contribute to the function of the vaginal
 2648 microbiome and modulate host-*Trichomonas vaginalis* interactions. **Molecular**
 2649 **Microbiology**, 2023. doi: 10.1111/mmi.15130.

2650 BAEK, K.H., PHAN, T.N., MALWAL, S.R., LEE, H., LI, Z.-H., MORENO, S.N.J.,
 2651 OLDFIELD, E., NO, J. H. In vivo efficacy of SQ109 against *Leishmania*
 2652 *donovani*, *Trypanosoma* spp. and *Toxoplasma gondii* and in vitro activity of
 2653 SQ109 metabolites. **Biomedicines** 10, 670, 2022.
 2654 <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030670>.

2655 BANDEIRA, PT., DE SOUZA, W. Costain 1 (ARM19800.1) - The first identified
 2656 protein of the costa of the pathogenic protozoan *Tritrichomonas foetus*.
 2657 **Experimental Parasitology**, 232,108-177, 2022. doi:
 2658 10.1016/j.exppara.2021.108177.

2659 BANDEIRA, PT., ORTIZ, SFDN., BENCHIMOL, M., DE SOUZA, W. Expansion
 2660 microscopy of trichomonads. **Experimental Parasitology**, 255,108-629, 2023.
 2661 doi: 10.1016/j.exppara.2023.108629.

2662 BARRIAS, E., REIGNAULT, LC., CALOGEROPOULOU, T., DE SOUZA, W. In
 2663 vitro activities of adamantylidene-substituted alkylphosphocholine TCAN26
 2664 against *Trypanosoma cruzi*: Antiproliferative and ultrastructural effects.
 2665 **Experimental Parasitology**, 206, 107730, 2019. doi:
 2666 10.1016/j.exppara.2019.107730.

2667 BENAÏM, G., CASANOVA, P., HERNANDEZ-RODRIGUEZ, V., MUJICA-
 2668 GONZALEZ, S., PARRA-GIMENEZ, N., PLAZA-ROJAS, L., CONCEPCION,
 2669 JL., LIU, YL., OLDFIELD, E., PANIZ-MONDOLFI, A., SUAREZ, AI.
 2670 Dronedarone, an amiodarone analog with improved anti-*Leishmania mexicana*

2671 efficacy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 58, 2295-303, 2014. doi:
 2672 10.1128/AAC.01240-13.

2673

2674 BENAİM, G., J. SANDERS, Y. GARCIA-MARCHAN, C. COLINA, R. LIRA, A.
 2675 CALDERA, G. PAYARES, C. SANOJA, J. BURGOS, A. LEON-ROSSELL, J.
 2676 CONCEPCION, A., SCHIJMAN, M., LEVIN, E., OLDFIELD, J. URBINA.
 2677 Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts
 2678 synergistically with posaconazole. **Journal of Medicinal Chemistry**, 49, 892–
 2679 899, 2006. doi: 10.1021/jm050691f.

2680

2681 BENAİM, G., PANIZ-MONDOLF, AE. The emerging role of amiodarone and
 2682 dronedarone in Chagas disease. **Nature Reviews Cardiology**, 9:605–609,
 2683 2012. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.108>.

2684

2685 BENAİM, G., PANIZ-MONDOLFI, A.E., SORDILLO, EM., MARTINEZ-
 2686 SOTILLO, N. Disruption of intracellular calcium homeostasis as a therapeutic
 2687 target against *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection**
 2688 **Microbiology**, 10, 46, 2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.00046.

2689 BENAİM, G., PANIZ-MONDOLF, A.E., SORDILO, EM. The rationale for use of
 2690 amiodarone and its derivatives for treatment of Chagas' disease and
 2691 leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**, 27, 1825–1833, 2021. doi:
 2692 10.2174/1381612826666200928161403.

2693 BENCHIMOL, M. Hydrogenosome autophagy in *Tritrichomonas foetus*: an
 2694 ultrastructural and cytochemical study. **Biology of the Cell**, 91, 165-174, 1999.
 2695 doi: 10.1016/s0248-4900(99)80039-2.

2696 BENCHIMOL, M. Hydrogenosome morphological variation induced by
 2697 fibronectin and other drugs in *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*.
 2698 **Parasitology Research**, 87, 215-222, 2001. doi: 10.1007/s004360000329.

2699 BENCHIMOL, M. Trichomonads under Microscopy. **Microscopy and**
 2700 **Microanalysis**, 10, 528-550, 2004. doi: 10.1017/S1431927604040905.

2701 BENCHIMOL, M. The hydrogenosomes as a drug target. **Current**
 2702 **Pharmaceutical Design**, 14, 872-881, 2008. doi:
 2703 10.2174/138161208784041114. PMID: 18473836.

2704 BENCHIMOL, M., ALMEIDA, J.C., DE SOUZA, W. Further studies on the
 2705 organization of the hydrogenosome in *Tritrichomonas foetus*. **Tissue and Cell**,
 2706 28, 287-299, 1996a. doi: 10.1016/s0040-8166(96)80016-4.

2707 BENCHIMOL, M., ALMEIDA, J. C., LINS, U., GONÇALVES, N. R., DE SOUZA,
 2708 W. Electron microscopic study of the effect of zinc on *Tritrichomonas foetus*.

2709 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 37, 2722-1726, 1993. doi:
2710 10.1128/AAC.37.12.2722.

2711 BENCHIMOL, M., BATISTA, C., DE SOUZA, W. Fibronectin-and laminin-
2712 mediated endocytic activity in the parasitic protozoa *Trichomonas vaginalis* and
2713 *Tritrichomonas foetus*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**,
2714 22, 39-45, 1990.

2715 BENCHIMOL, M., BERNARDINO, M. Ultrastructural localization of
2716 glycoconjugates in *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, 88, 134–
2717 143, 2002. <https://doi.org/10.1007/s004360100466>.

2718 BENCHIMOL, M., DA CUNHA E SILVA, N.L., ELIAS, C.A., DE SOUZA, W.
2719 *Tritrichomonas foetus*: ultrastructure and cytochemistry of endocytosis.
2720 **Experimental Parasitology**, 62, 405-415, 1986. doi: 10.1016/0014-
2721 4894(86)90049-4.

2722 BENCHIMOL, M., DE SOUZA, W. Carbohydrate involvement in the association
2723 of a prokaryotic cell with *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*.
2724 **Parasitology Research**, 81, 459-464, 1995. doi: 10.1007/BF00931786.

2725 BENCHIMOL, M., DINIZ, J. A. P., RIBEIRO, K. The fine structure of the
2726 axostyle and its associations with organelles in trichomonads. **Tissue and Cell**,
2727 32, 178-18, 2000. doi: 10.1054/tice.2000.0102.

2728 BENCHIMOL, M., ELIAS, C.A., DE SOUZA, W. Specializations in the flagellar
2729 membrane to *Tritrichomonas foetus*. **Journal of Parasitology**, 67, 174-178,
2730 1981.

2731 BENCHIMOL, M., ELIAS, C.A., DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*:
2732 ultrastructural localization of calcium in the plasma membrane and in the
2733 hydrogenosome. **Experimental Parasitology**, 54, 277-284, 1982. doi:
2734 10.1016/0014-4894(82)90036-4.

2735 BENCHIMOL, M., ELIAS, C.A., DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*: fine
2736 structure of freeze-fracture membranes. **The Journal of Protozoology**, 29,
2737 348-353, 1982a. doi: 10.1111/j.1550-7408.1982.tb05413. x.

2738 BENCHIMOL, M., ELIAS, C.A., DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*:
2739 ultrastructural localization of basic proteins and carbohydrates. **Experimental**
2740 **Parasitology**, 54, 135-144, 1982b. doi: 10.1016/0014-4894(82)90036-4.

2741 BENCHIMOL, M., GADELHA, AP., DE SOUZA, W. Unusual cell structures and
2742 organelles in *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* are potential drug
2743 targets. **Microorganisms**, 2, 10-2176, 2022. doi:
2744 10.3390/microorganisms10112176

- 2745 BENCHIMOL, M., KACHAR, B., DE SOUZA, W. Surface domains in the
2746 pathogenic protozoan *Tritrichomonas foetus*. **The Journal of Protozoology**,
2747 39, 480-484, 1992. doi: 10.1111/j.1550-7408. 1992.tb04835. x.
- 2748 BENCHIMOL, M., DINIZ, J.A., RIBEIRO, K. The fine structure of the axostyle
2749 and its associations with organelles in Trichomonads. **Tissue and Cell**, 32,
2750 178-187, 2000. doi: 10.1054/tice.2000.0102.
- 2751 BENCHIMOL, M., JOHNSON, P.J., DE SOUZA, W. Morphogenesis of the
2752 hydrogenosome: an ultrastructural study. **Biology of the Cell**, 87,197-205,
2753 1996b.
- 2754 BENCHIMOL, M., RIBEIRO, K.C., MARIANTE, R.M., ALDERETE, J.F.
2755 Structure and division of the Golgi complex in *Trichomonas vaginalis* and
2756 *Tritrichomonas foetus*. **European Journal of Cell Biology**, 80, 593-607, 2001.
2757 doi: 10.1078/0171-9335-00191.
- 2758 BENCHIMOL, M., PEREIRA NETO, A., MIRANDA-MAGALHAES, A., DE
2759 SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*: new structures by high-resolution scanning
2760 helium ion microscopy. **Intech Biocell**, 2, 23, 2021. doi:
2761 10.32604/biocell.2021.014599.
- 2762 BERGSTROM, J.D., DUFRESNE, C., BILLS, G.F., NALLIN-OMSTEAD, M.,
2763 BYRNE, K. Discovery, synthesis and mechanism of action of the zaragozic
2764 acids: potent inhibitors of squalene synthase. **Annual Review of Microbiology**,
2765 49, 607–639, 1995. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003135.
- 2766 BONILHA, V.L., CIAVAGLIA, M.C., DE SOUZA, W., COSTA E SILVA FILHO, F.
2767 The involvement of terminal carbohydrates of the mammalian cell surface in the
2768 cytoadhesion of trichomonads. **Parasitology Research**, 81, 21-126, 1995. doi:
2769 10.1007/BF00931616.
- 2770 BOSE, S., AGGARWAL, S., SINGH, D.V., ACHARYA, N. Extracellular vesicles:
2771 An emerging platform in gram-positive bacteria. **Microbial Cell**, 5,7,312-322,
2772 2020. doi: 10.15698/mic2020.12.737.
- 2773 BRADIC, M., WARRING, SD., TOOLEY, GE., SCHEID, P., SECOR, WE.,
2774 LAND, KM., HUANG, PJ., CHEN, TW., LEE, CC., TANG, P., SULLIVAN, SA.,
2775 CARLTON, JM. Genetic indicators of drug resistance in the highly repetitive
2776 genome of *Trichomonas vaginalis*. **Genome Biology and Evolution**, 1,9,1658-
2777 1672, 2017. doi: 10.1093/gbe/evx110.
- 2778 BRUGEROLLE, G., BRICHEUS, G., COFFE, G. Centrin protein and genes in
2779 *Trichomonas vaginalis* and close relatives. **Journal of Eukaryotic**
2780 **Microbiology**, 47, 129-138, 2000. doi: 10.1111/j.1550-7408. 2000.tb00022. x.

2781 BUI, E.T., e JOHNSON, P.J. Identification and characterization of [Fe]-
 2782 hydrogenases in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. **Molecular and**
 2783 **Biochemical Parasitology**, 76, 305-310, 1996. doi: 10.1016/0166-
 2784 6851(96)02567-4.

2785 BURGESS, D.E., KOBLOCK, K.F., DAUGHERTY, T., ROBERTSON, N.P.
 2786 Cytotoxic and hemolytic effects of *Tritrichomonas foetus* on mammalian cells.
 2787 **Infection and Immunity**, 58, 3627-3632, 1990. doi: 10.1128/iai.58.11.3627-
 2788 3632.

2789 CARLTON, J. M., HIRT, R. P., SILVA, J. C., DELCHER, A. L., SCHATZ, M.,
 2790 ZHAO, Q., WORTMAN, J.R., BIDWELL, S.L., ALSMARK, U.C., BESTEIRO, S.,
 2791 SICHERITZ-PONTEN, T., NOEL, C.J., DACKS, J.B., FOSTER, P.G.,
 2792 SIMILION, C., VAN DE PEER, Y., MIRANDA-SAAVEDRA, D., BARTON, G.J.,
 2793 WESTROP, G.D., MULLER, S., DESSI, D., FIORI, M.T., HAYES, R.D.,
 2794 MUKHERJEE, M., OKMURA, C.Y., SCHNEIDER, R., SMITH, A.J.,
 2795 VANACOVA, S., VILALVAZO, M., HAAS, B.J., PERTEA, M., FELDBLYUM,
 2796 T.V., UTTERBACK, T.R., SHU, C.L., OSOEGAWA, K., DE JONG, P.J., HRDY,
 2797 I., HORVATHOVA, L., ZUBACOVA, Z., DOLEZAL, P., MALIK, S.B.,
 2798 LOGSDON, J.M., HENZE, K., GUPTA, A., WANG, C.C., DUNNE, R.L.,
 2799 UPCROFT, J.A., UPCROFT, P., WHITE, O., SALZBERG, S.L., TANG, P.,
 2800 CHIU, C.H., LEE, Y.S., EMBLEY, T.M., COOMBS, G.H., MOTTRAM, J.C.,
 2801 TACHEZY, J., FRASER-LIGGETT, C.M., JONSHON, P.J. Draft genome
 2802 sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*.
 2803 **Science**, 315, 207-212, 2007. doi: 10.1126/science.

2804 CAVALIER-SMITH, T. Kingdom protozoa and its 18 Phyla. **Microbiology**
 2805 **Review**, 57, 953-994, 1993. doi: 10.1128/mr.57.4.953-994.1993.

2806 CAMPO, V.A. Comparative effects of histone deacetylases inhibitors and
 2807 resveratrol on *Trypanosoma cruzi* replication, differentiation, infectivity and gene
 2808 expression. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug**
 2809 **Resistance**, 7, 23–33, 2017. doi: 10.1016/j.ijpddr.2016.12.003.

2810 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Fourth report on
 2811 human exposure to environmental chemicals, updated tables, (March 2021).
 2812 **Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control**
 2813 **and Prevention**. <https://www.cdc.gov/exposurereport/>.

2814 CERKASOVÁ, A., CERKASOY, J., KULDA, J., REISCHIG, J. Circular DNA
 2815 and cardiolipin in hydrogenosomes, microbody-like organelles of trichomonads.
 2816 **Folia Parasitologica**, 23, 33-37, 1976.

2817 CHAIYAWAT, P., PRUKSAKORN, D., PHANPHAISARN, A., TEEYAKASEM,
 2818 P., KLANGJORHOR, J., SETTAKORN, J. Expression patterns of class I histone
 2819 deacetylases in osteosarcoma: a novel prognostic marker with potential

therapeutic implications. **Modern Pathology**, 31, 264–274, 2017.
doi:10.1038/modpathol.2017.125.

CHAPMAN, A., CAMMACK, R., LINSTEAD, D., LLOYD, D. The generation of metronidazole radicals in hydrogenosomes isolated from *Trichomonas vaginalis*. **Journal of General Microbiology**, 131, 2141–2144, 1985.
<https://doi.org/10.1099/00221287-131-9-2141>.

COSAR, C. e JULOU, L. Activity of 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (8823 RP) against experimental *Trichomonas vaginalis* infection. **Annales de l'Institut Pasteur**, 96, 238–241, 1959.

CONNOR, T. H., STOECKEL, M., EVRARD, J., LEGATOR, M. S. The contribution of metronidazole and two metabolites to the mutagenic activity detected in the urine in treated humans and mice. **Cancer Research**, 37, 629–640, 1977.

CORBEIL, L.B. Vaccination strategies against *Trichomonas foetus*. **Parasitology Today**, 10, 103–106, 1994. doi: 10.1016/0169-4758(94)90009-4.

CORY, AH., OWEN, TC., BARLTROP, JA., CORY, JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Communications**, 3, 207–12, 1991. doi: 10.3727/095535491820873191.

CHAZAPI, E., MAGOULAS, GE., PROUSIS, KC., CALOGEROPOULOU, T. Phospholipid Analogues as Chemotherapeutic Agents Against Trypanosomatids. **Current Pharmaceutical Design**, 27, 1790–1806, 2021. doi: 10.2174/1381612826666201210115340.

CROSSNOE, C.R., GERMANAS, J.P., LEMAGUERES, P., MUSTATA, G., KRAUSE, K.L. The crystal structure of *Trichomonas vaginalis* ferredoxin provides insight into metronidazole activation. **Journal of Molecular Biology**, 318, 503–518, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00051-7).

CROUCH, M.L., ALDERETE, J.F. *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin. **Microbiology**, 145, 2835–2843, 1999.
<https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2835>.

DA SILVA PINTO, GV., BOLPET, E., MARTIN, LF., MOÇO, NP., RAMOS, BRA., SILVA, MC., DUARTE, MTC., DA ROCHA, TRISTÃO, A., DA SILVA, MG., MARCONI, C. Factors associated with *Trichomonas vaginalis* infection in reproductive-aged women attending cervical screening in southeast of Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, 27, 102–794, 2023. doi: 10.1016/j.bjid.2023.102794.

DE ANDRADE ROSA, I., CARUSO, M. B., DE OLIVEIRA SANTOS, E., GONZAGA, L., ZINGALI, R. B., DE VASCONCELOS, A. T. R., BENCHIMOL,

2857 M. The costa of trichomonads: A complex macromolecular cytoskeleton
 2858 structure made of uncommon proteins. **Biology of the Cell**, 109, 238–253,
 2859 2017. doi:10.1111/boc.201600050.

2860 DE AZEVEDO, N.L., DE SOUZA, W. (1992). A cytochemical study of the
 2861 interaction between *Tritrichomonas foetus* and mouse macrophages.
 2862 **Parasitology Research**, 78, 545-552, 1992. doi: 10.1007/BF00936450.

2863 DE AZEVEDO, N.L., DE SOUZA, W. An ultrastructural and cytochemical of
 2864 *Tritrichomonas foetus*-eosinophil interaction. **Journal of Submicroscopic**
 2865 **Cytology and Pathology**, 28, 243-249, 1996.

2866 DE BRUM VIEIRA, P., TASCA, T., SECOR, WE. Challenges and persistent
 2867 questions in the treatment of trichomoniasis. **Current Topics in Medicinal**
 2868 **Chemistry**, 17, 1249-1265, 2017. doi: 10.2174/1568026616666160930150429.

2869 DE SOUZA, W., BARRIAS, E. S. Membrane-bound extracellular vesicles
 2870 secreted by parasitic protozoa: cellular structures involved in the communication
 2871 between cells. **Parasitology Research**, 119, 7, 2020. doi: 10.1007/s00436-
 2872 020-06691-7.

2873 DE SOUZA, TG., BENAÏM, G., DE SOUZA, W., BENCHIMOL, M. Effects of
 2874 amiodarone, amioder, and dronedarone on *Trichomonas vaginalis*.
 2875 **Parasitology Research**, 121, 1761-1773, 2022. doi: 10.1007/s00436-022-
 2876 07521-8.

2877 DE SOUZA, W.; GODINHO, J., BARRIAS, E., ROUSSAKI, M., RODRIGUES, J.
 2878 C.F., CALOGEROPOULOU, T. Effects of phospholipid analogues on
 2879 trypanosomatids. **Molecular Biology of Kinetoplastid Parasites**, 13. 2018.
 2880 doi.org/10.21775/9781910190715.13.

2881 DE SOUZA, TG., GRANADO, R., BENAÏM, G., DE SOUZA, W., BENCHIMOL,
 2882 M. Effects of SQ109 on *Trichomonas vaginalis*. **Experimental Parasitology**,
 2883 250,108549, 2023. doi: 10.1016/j.exppara.2023.108549.

2884 DOCAMPO, R., MORENO, SN. Calcium regulation in protozoan parasites.
 2885 **Current Opinion in Microbiology**, 6,359–364, 2003.
 2886 https://doi.org/10.1016/s1369-5274(03)0009).

2887 DONNÉ, A. Animacules observés dans les maitères purulentes et le produit des
 2888 sécrétions des organes génitaux de l’homme et de la femme. **Comptes rendus**
 2889 **de l'Académie des Sciences**, 3, 385-386, 1836.

2890 DRUREY, C., MAIZELS, RM. Helminth extracellular vesicles: Interactions with
 2891 the host immune system. **Molecular Immunology**, 137, 124-133, 2021. doi:
 2892 10.1016/j.molimm.2021.06.017.

- 2893 EDINGER, AL., THOMPSON, CB. Death by design: apoptosis, necrosis, and
2894 autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, 6, 663-9, 2004. doi:
2895 10.1016/j.ceb.2004.09.011.
- 2896 EDWARDS, D. I. Nitroimidazole drugs—action and resistance mechanisms. I.
2897 Mechanisms of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 31, 9–20,
2898 1993. doi: 10.1093/jac/31.1.9.
- 2899 EMBLEY, T.M. Multiple secondary origins of the anaerobic lifestyle in
2900 eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. International Journal of*
2901 **Biological Sciences**, 361, 1055-1067, 2006. doi: 10.1098/rstb.2006.1844.
- 2902 ENGEL, J.A., JONES, A.J., AVERY, V.M., SUMANADASA S.D.M., NG, S.S.,
2903 FAIRLIE, D.P., ADAMS, T.S., ANDREWS, K.T. Profiling the anti-protozoal
2904 activity of anti-cancer HDAC inhibitors against *Plasmodium* and *Trypanosoma*
2905 parasites. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug**
2906 **Resistance**, 5, 117–126, 2015. doi: 10.1016/j.ijpddr.2015.05.004.
- 2907 FELLEISEN, R.S. Host-parasite interaction in bovine infection with *Trichomonas*
2908 *foetus*. **Microbes and Infection**, 1, 807-816, 1999. doi: 10.1016/s1286-
2909 4579(99)80083-5.
- 2910 FICHOROVA, R.N. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses
2911 and reproductive outcome. **Journal of Reproductive Immunology**, 83, 185–
2912 189, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.08.007>.
- 2913 FUNG, HB., DOAN, TL. Tinidazole: a nitroimidazole antiprotozoal agent.
2914 **Clinical Therapeutics**, 27, 1859-84, 2005. doi: 10.1016/j.clinthera.2005.12.012.
- 2915 FURTADO, M.B., BENCHIMOL, M. (1998). Observation of membrane fusion on
2916 the interaction of *Trichomonas vaginalis* with human vaginal epithelial cells.
2917 **Parasitology Research**, 84, 213-220, 1998. doi: 10.1007/s004360050385.
2918 PMID: 9521011.
- 2919 GAJATE, C., MOLLINEDO, F. Biological activities, mechanisms of action and
2920 biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH (3)
2921 (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. **Current Drug Metabolism**,
2922 3, 491-525, 2002. doi: 10.2174/1389200023337225.
- 2923 García-García, V., OLDFIELD, E., BENAİM, G. Inhibition of *Leishmania*
2924 *mexicana* growth by the tuberculosis drug SQ109. **Antimicrobial Agents and**
2925 **Chemotherapy**, 23, 60, 6386-9, 2016. doi: 10.1128/AAC.00945-16.
- 2926 GARBER, G.E., LEMCHUK-FAVEL, L.T. Characterization and purification of
2927 extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. **Canadian Journal of**
2928 **Microbiology**, 35, 903-909, 1989. doi: 10.1139/m89-150.

2929 GARRETT, N. J., OSMAN, F., MAHARAJ, B., NAICKER, N., GIBBS, A.,
 2930 NORMAN, E., SAMSUNDER, N., NGOBESE, H., MITCHEV, N., SINGH, R.,
 2931 ABDOOL KARIM, S. S., KHARSANY, A. B. M., MLISANA, K., ROMPALO, A.,
 2932 MINDEL, A. Beyond syndromic management: opportunities for diagnosis-based
 2933 treatment of sexually transmitted infections in low-and middle-income countries.
 2934 **PloS One**, 13, e0196209, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0196209

2935 GAULT, R. A., KVASNICKA, W.G., HANKS, D., HANKS, M., HALL, M.R.
 2936 Specific antibodies in serum and vaginal mucus of heifers inoculated with a
 2937 vaccine containing *Tritrichomonas foetus*. **American Journal of Veterinary**
 2938 **Research**, 56, 454-459, 1995.

2939 GHOSH, AP., AYCOCK, C., SCHWEBKE, JR. In vitro study of the susceptibility
 2940 of clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole and secnidazole.
 2941 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 62, e02329-17,2018. doi:
 2942 10.1128/AAC.02329-17.

2943 GIL, Z., MARTINEZ-SOTILLO, N., PINTO-MARTINEZ, A., MEJIAS, F.,
 2944 MARTINEZ, J.C., GALINDO, I., OLDFIELD, E., BENAÏM, G. SQ109 inhibits
 2945 proliferation of *Leishmania donovani* by disruption of intracellular
 2946 Ca²⁺ homeostasis, collapsing the mitochondrial electrochemical potential ($\Delta\Psi_m$)
 2947 and affecting acidocalcisomes. **Parasitology Research**, 119, 649-657, 2020.
 2948 doi: 10.1007/s00436-019-06560-y.

2949 GILBERT, R.O., ELIA, G., BEACH, D.H., KLAESSIG, S., SING, B.N.
 2950 Cytopathogenic effects of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial
 2951 cells cultured *in vitro*. **Infection and Immunity**, 68, 4200-4206, 2000. doi:
 2952 10.1128/IAI.68.7.4200-4206.2000.

2953 GODINHO, JLP., GEORGIKOPOULOU, K., CALOGEROPOULOU, T., DE
 2954 SOUZA, W., RODRIGUES, JCF. A novel alkyl phosphocholine-dinitroaniline
 2955 hybrid molecule exhibits biological activity in vitro against *Leishmania*
 2956 *amazonensis*. **Experimental Parasitology**, 135, 153-65, 2013. doi:
 2957 10.1016/j.exppara.2013.06.015.

2958 GONZÁLEZ-ROBLES, A., LÁZARO-HALLER, A., ESPINOSA-CANTELLANO,
 2959 M., ANAYAVELÁZQUEZ, F., MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Trichomonas vaginalis*:
 2960 ultrastructural bases of the cytopathic effect. **Eukaryotic Microbiology**, 42,
 2961 641-651, 1995. doi: 10.1111/j.1550-7408.1995.tb05921. x.

2962 GRANGER, B.L., WARWOOD, S.J. Rapid internalization and degradation of
 2963 surface-bound antibodies by *Trichomonas foetus*. **Journal of Parasitology**, 82,
 2964 539-549, 1996.

2965 GRANGER, B. L., WARWOOD, S. J., BENCHIMOL, M., DE SOUZA, W.
 2966 Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology**
 2967 **Research**, 86, 699-709, 2000. doi: 10.1007/pl00008555.

2968 HASHEMI, N., OMMI, D., KHEYRI, P., KHAMESIPOUR, F., SETZER, W.N.,
 2969 BENCHIMOL, M. A review study on the anti-trichomonas activities of medicinal
 2970 plants. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**,
 2971 15, 92–104, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.01.002>.

2972 HEJCHMAN, E., OSTROWSKA, K., MACIEJEWSKA, D., KOSSAKOWSKI, J.,
 2973 COURCHESNE, JE. Synthesis and antifungal activity of derivatives of 2- and 3-
 2974 benzofurancarboxylic acids. **Journal of Pharmacology and Experimental**
 2975 **Therapeutics**, 343:380–388, 2012. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.196980>.

2976 HERNÁNDEZ CERUELOS, A., ROMERO-QUEZADA, LC., RUVALCABA
 2977 LEDEZMA, JC., LÓPEZ CONTRERAS, L. Therapeutic uses of metronidazole
 2978 and its side effects: an update. **European Review for Medical and**
 2979 **Pharmacological Sciences**, 23,397-401,2019. doi:
 2980 10.26355/eurrev_201901_16788.

2981 HIRT, R.P. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview.
 2982 **Sexually Transmitted Infections**, 89, 439–443, 2013. doi: 10.1136/sextrans-
 2983 2013-051105.

2984 HIRT, R. P., DE MIGUEL, N., NAKJANG, S., DESSI, D., LIU, Y. C., DIAZ, N.,
 2985 RAPPELLI, P., ACOSTA-SERRANO, A., FIORI, P. L., MOTTRAM, J. C.
 2986 *Trichomonas vaginalis* pathobiology: new insights from the genome sequence.
 2987 **Advances in Parasitology**, 77, 87-140, 2011. doi: 10.1016/B978-0-12-391429-
 2988 3.00006-X.

2989 HOBBS, M. M., SEÑA, A. C. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis*
 2990 infection. **Sexually Transmitted Infections**, 89,6,434-438, 2013. doi:
 2991 10.1136/sextrans-2013-051057.

2992 HONIGBERG, B.M., MATTERN, C.F., DANIEL, W.A. Fine structure of the
 2993 mastigont system in *Tritrichomonas foetus*. **Journal of Protozoology**, 18, 183-
 2994 198, 1971. doi: 10.1111/j.1550-7408. 1971.tb03306. x.

2995 HONIGBERG, B.M., BRUGEROLLE, G. Structure. In: Honigberg B.M. (Ed.),
 2996 **Trichomonads Parasitic in Humans**, 5-35, 1990.

2997 HRDÝ, I., CAMMACK, R., STOPKA, P., KULDA, J., TACHEZY, J. Alternative
 2998 pathway of metronidazole activation in *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes.
 2999 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49, 5033-5036, 2005. doi:
 3000 10.1128/AAC.49.12.5033-5036.2005.

3001 HRDÝ, I., MÜLLER, M. Primary structure and eubacterial relationships of the
 3002 pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote
 3003 *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Molecular Evolution**, 41, 388-396, 1995.

3004

3005 IBÁÑEZ-ESCRIBANO, A., NOGAL-RUIZ, J.J. The past, present, and future in
 3006 the Diagnosis of a Neglected Sexually Transmitted Infection: Trichomoniasis.
 3007 **Pathogens**, 13, 126, 2024. <https://doi.org/10.3390/pathogens13020126>.

3008 IRVINE, L., FLYNN, RWV., LIBBY, G., CROMBIE, IK., EVANS, JM. Drugs
 3009 dispensed in primary care during pregnancy: a record-linkage analysis in
 3010 Tayside, Scotland. **Drug Safety**, 33, 593–604, 2010. doi: 10.2165/11532330-
 3011 000000000-00000.

3012 JHA, TK., SUNDAR, S., THAKUR, CP., BACHMANN, P., KARBWANG, J.,
 3013 FISCHER, C., VOSS, A., BERMAN, J. Miltefosine, an oral agent, for the
 3014 treatment of Indian visceral leishmaniasis. **The New England Journal of**
 3015 **Medicine**, 1999 9,341,1795-800, 1999. doi: 10.1056/NEJM199912093412403.

3016 JULIO, A., URBINA. Mechanisms of action of lysophospholipid analogues
 3017 against trypanosomatid parasites, **Transactions of The Royal Society of**
 3018 **Tropical Medicine and Hygiene**, 100, S9–S16, 2006.
 3019 <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.03.010>.

3020 KALRA, H., SIMPSON, RJ., JI H., AIKAWA, E., ALTEVOGT, P., ASKENASE,
 3021 P., BOND, VC., BORRÀS, FE., BREAKFIELD, X., BUDNIK, V., BUZAS, E.,
 3022 CAMUSSI, G., CLAYTON, A., COCUCCI, E., FALCON-PEREZ, JM.,
 3023 GABRIELSSON, S., GHO, YS., GUPTA, D., HARSHA, HC., HENDRIX, A.,
 3024 HILL, AF., INAL, JM., JENSTER, G., KRÄMER-ALBERS, EM., LIM, SK.,
 3025 LLORENTE, A., LÖTVALL, J., MARCILLA, A., MINCHEVA-NILSSON, L.,
 3026 NAZARENKO, I., NIEUWLAND, R., NOLTE-'T HOEN, EN., PANDEY, A.,
 3027 PATEL, T., PIPER, MG., PLUCHINO, S., PRASAD, TS., RAJENDRAN, L.,
 3028 RAPOSO, G., RECORD, M., REID, GE., SÁNCHEZ-MADRID, F.,
 3029 SCHIFFELERS, RM., SILJANDER, P., STENSALLE, A., STOORVOGEL, W.,
 3030 TAYLOR, D., THERY, C., VALADI, H., VAN BALKOM, BW., VÁZQUEZ, J.,
 3031 VIDAL, M., WAUBEN, MH., YÁÑEZ-MÓ, M., ZOELLER, M., MATHIVANAN, S.
 3032 Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous
 3033 community annotation. **PLOS Biology**, 10: e1001450, 2012. doi:
 3034 10.1371/journal.pbio.1001450.

3035 KAO, CY., PAPOUTSAKIS, ET. Extracellular vesicles: exosomes,
 3036 microparticles, their parts, and their targets to enable their biomanufacturing
 3037 and clinical applications. **Current Opinion in Biotechnology**, 60:89-98, 2019.
 3038 doi: 10.1016/j.copbio.2019.01.005.

3039 KAZY, Z., PUHÓ, E., CZEIZEL, AE. Teratogenic potential of vaginal
 3040 metronidazole treatment during pregnancy. **European Journal of Obstetrics &**
 3041 **Gynecology and Reproductive Biology**, 123,174–178, 2005. doi:
 3042 10.1016/j.ejogrb.2005.03.016.

3043 KELLER, S., RIDINGER, J., RUPP, A. K. Body fluid derived exosomes as a
 3044 novel template for clinical diagnostics. **Journal of Translational Medicine**,
 3045 9, 86, 2011. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-86>

3046 KENT, H. L. Epidemiology of vaginitis. **American Journal of Obstetrics and**
 3047 **Gynecology**, 165, 1198-1176, 1991. doi: 10.1016/s0002-9378(12)90722-x.

3048 KIRKCALDY, RD., AUGOSTINI, P., ASBEL, LE., BERNSTEIN, KT., KERANI,
 3049 RP., METTENBRINK, CJ., PATHELA, P., SCHWEBKE, JR., SECOR, WE.,
 3050 WORKOWSKI, KA., DAVIS, D., BRAXTON, J., WEINSTOCK, HS. *Trichomonas*
 3051 *vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD Surveillance
 3052 Network, 2009-2010. **Emerging Infectious Diseases**, 18, 939-43, 2012. doi:
 3053 10.3201/eid1806.111590.

3054 KISSINGER, P. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and
 3055 treatment issues. **BMC Infectious Diseases**, 15, 307, 2015. DOI:
 3056 10.1186/s12879-015-1055-0.

3057 KULDA, J. Trichomonads hydrogenosomes and drug resistance. **International**
 3058 **Journal for Parasitology**, 29, 199–212, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0020-](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00155-6)
 3059 [7519\(98\)00155-6](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00155-6).

3060 KÜNG, E., FÜRNKRANZ, U., WALOCHNIK, J. Chemotherapeutic options for
 3061 the treatment of human trichomoniasis. **International Journal of Antimicrobial**
 3062 **Agents**, 53, 116–127, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.10.016>.

3063 KRIEGER, J.N., RAVDIN, J., REIN, M.F. Contact dependent cytopathogenic
 3064 mechanisms of *Trichomonas vaginalis*. **Infection and Immunity**, 50, 768–770,
 3065 1985. doi: 10.1128/iai.50.3.778-786.1985.

3066 KURDISTANI, S.K., GRUNSTEIN, M. Histone acetylation and deacetylation in
 3067 yeast. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 4, 276–284, 2003. doi:
 3068 10.1038/nrm1075.

3069 LAND, KM., CLEMENS, DL., JOHNSON, PJ. Loss of multiple hydrogenosomal
 3070 proteins associated with organelle metabolism and high-level drug resistance in
 3071 trichomonads. **Experimental Parasitology**, 7, 102-10, 2001. doi:
 3072 10.1006/expr.2001.4587.

3073 LEE, K.E., KIM, J.H., JUNG, M.K., ARII, T., RYU, J.S., HAN, S.S. Three-
 3074 dimensional structure of the cytoskeleton in *Trichomonas vaginalis* revealed
 3075 new features. **Journal of Electron Microscopy**, 58, 305-313, 2009. doi:
 3076 10.1093/jmicro/dfp019.

3077 LEHKER, M.W., SWEENEY, D. Trichomonad invasion of the mucous layer
 3078 requires adhesins, mucinases, and motility. **Sexually Transmitted Infections**,
 3079 75, 231-238, 1999. doi: 10.1136/sti.75.4.231.

3080 LEITSCH D. A review on metronidazole: an old warhorse in antimicrobial
 3081 chemotherapy. **Parasitology**, 146,1167-1178, 2019. doi:
 3082 10.1017/S0031182017002025.

3083 LEITSCH, D., JANSSEN, B.D., KOLARICH, D., JOHNSON, P.J. & DUCHÊNE,
 3084 M. *Trichomonas vaginalis* flavin reductase 1 and its role in metronidazole
 3085 resistance. **Molecular Microbiology**, 91, 198–208, 2014. doi:
 3086 10.1111/mmi.12455.

3087 LEWIS, D. A., HABGOOD, L., WHITE, R., BARKER, K., MURPHY., S. M.
 3088 Managing vaginal trichomoniasis resistant to high-dose metronidazole therapy.
 3089 **International Journal of STD e AIDS**, 8, 780–784, 1997. doi:
 3090 10.1258/0956462971919110.

3091 LEWIS D.A. Trichomoniasis. **Medicine** 38, 291–293, 2010.
 3092 <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2010.03.007>.

3093 LINDMARK, D. G. e MULLER, M. Antitrichomonad action, mutagenicity, and
 3094 reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. **Antimicrobial Agents**
 3095 **and Chemotherapy**, 10, 476–482, 1976. doi: 10.1128/AAC.10.3.476.

3096 LOCKWOOD, B. C., NORTH, M. J., COOMBS, G. H. *Trichomonas foetus*, and
 3097 *Trichomonas batrachorum*: comparative proteolytic activity. **Experimental**
 3098 **Parasitology**, 58, 245-253, 1984. doi: 10.1016/0014-4894(84)90041-9.

3099 LOSSICK, J. G. Epidemiology of urogenital trichomoniasis. Therapy of
 3100 urogenital trichomoniasis, p. 324–341. In B. M. Honigberg (ed), **Trichomonads**
 3101 **Parasitic in Humans**, Springer-Verlag, New York, N.Y, 1990. doi:
 3102 10.1128/CMR.17.4.783-793.2004.

3103 LLOYD, D., POOLE, R. K., CHANCE, B. The reaction of cytochrome oxidase
 3104 with oxygen in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* 972h-. Studies at
 3105 subzero temperatures and measurement of apparent oxygen affinity.
 3106 **Biochemical Journal**, 184, 555-563, 1979. doi: 10.1042/bj1840555.

3107 MADEIRO DA COSTA, R. F., BENCHIMOL, M. The effect of drugs on cell
 3108 structure of *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, 92,159-170, 2004.
 3109 doi: 10.1007/s00436-003-1023-2.

3110 MAGOULAS, GE., AFROUDAKIS, P., GEORGIKOPOULOU, K., ROUSSAKI,
 3111 M., BORSARI, C., FOTOPOULOU, T., SANTAREM, N., BARRIAS, E., TEJERA
 3112 NEVADO, P., HACHENBERG, J., BIFELD, E., ELLINGER, B., KUZIKOV, M.,
 3113 FRAGIADAKI, I., SCOULICA, E., CLOS, J., GUL, S., COSTI, MP., DE SOUZA,
 3114 W., PROUSIS, KC., CORDEIRO, DA., SILVA, A., CALOGEROPOULOU, T.
 3115 Design, synthesis and antiparasitic evaluation of click phospholipids.
 3116 **Molecules**,10, 26, 4204, 2021. doi: 10.3390/molecules26144204.

3117 MAIA, C., ATTIAS, M., URBINA, J., GILBERT, I., MAGARACI, F., DE SOUZA,
3118 W. Azasterols impair *Giardia lamblia* proliferation and induces encystation.
3119 **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 16, 363, 310-6,
3120 2007. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.174.

3121 MAKKI, A., RADA, P., ŽÁRSKÝ, V., KEREÏCHE, S., KOVÁČIK, L., NOVOTNÝ,
3122 M., JORES, T., RAPAPORT, D. & TACHEZY, J. 2019. Triplet-pore structure of
3123 a highly divergent TOM complex of hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*.
3124 **PLoS Biology**, 17, 300-0098, 2019. doi: 10.1371/journal.pbio.3000098.

3125 MARIANTE, R. M., GUIMARÃES, C. A., LINDEN, R., BENCHIMOL, M.
3126 Hydrogen peroxide induces caspase activation and programmed cell death in
3127 the amitochondrial *Trichomonas fetus*. **Histochemistry and Cell Biology**,
3128 120, 129-41, 2003. doi: 10.1007/s00418-003-0548-x.

3129 MARIANTE, RM., VANCINI, RG., BENCHIMOL, M. Cell death in trichomonads:
3130 new insights. **Histochemistry and Cell Biology**, 125, 545-56, 2006. doi:
3131 10.1007/s00418-005-0098-5.

3132 MARTINEZ-SOTILLO, N., PINTO-MARTÍNEZ, A., HEJCHMAN, E., BENAÏM, G.
3133 Antiproliferative effect of a benzofuran derivate based on the structure of
3134 amiodarone on *Leishmania donovani* affecting mitochondria, acidocalcisomes
3135 and intracellular Ca²⁺ homeostasis. **International Journal for Parasitology**,
3136 70, 112-117, 2019. doi: 10.1016/j.parint.2019.02.006.

3137 MERCER, F; JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis*: pathogenesis, symbiont
3138 interactions, and host cell immune responses. **Trends in Parasitology**, 34,
3139 683-693, 2018. doi: 10.1016/j.pt.2018.05.006.

3140 MIELCZAREK E AND BLASZKOWSKA, J. *Trichomonas vaginalis*:
3141 pathogenicity and potential role in human reproductive failure. **Infection**, 44,
3142 447–458, 2016. doi: 10.1007/s15010-015-0860-0.

3143 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. Coordenação
3144 geral de desenvolvimento da epidemiologia em serviços. **Saúde e Vigilância**
3145 **Sanitária**, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2023/fevereiro/tricomoniase-e-a-ist-curavel-mais-comum-no-mundo>
3147 no-mundo

3148 MITCHELL, A.A., GILBOA, SM., WERLER, MM., KELLEY, KE., LOUIK, C.,
3149 HERNÁNDEZ-DÍAZ, S. Medication use during pregnancy, with particular focus
3150 on prescription drugs: 1976-2008. **American Journal of Obstetrics and**
3151 **Gynecology**, 205,51, 2011. doi: 10.1016/j.ajog.2011.02.029.

3152 MONTEIRO-LEAL, L. H., FARINA, M., BENCHIMOL, M., KACHAR, B., DE
3153 SOUZA, W. Coordinated flagellar and ciliary beating in the protozoon

3154 *Tritrichomonas foetus*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**., 42, 709-714,
3155 1995. doi: 10.1111/j.1550-7408. 1995.tb01621. x.

3156 MIDDLEJ, V., BENCHIMOL, M. *Trichomonas vaginalis* kills and eats - evidence
3157 for phagocytic activity as a cytopathic effect. **Parasitology**, 137, 65-76, 2010.
3158 doi: 10.1017/S0031182009991041.

3159 MIDDLEJ, V., DE SOUZA, W., BENCHIMOL, M. The peripheral vesicles gather
3160 multivesicular bodies with different behavior during the *Giardia intestinalis* life
3161 cycle. **Journal of Structural Biology**, 207,301-311, 2019. doi:
3162 10.1016/j.jsb.2019.07.002.

3163 MUANDA, FT., SHEEHY, O., BÉRARD, A. Use of antibiotics during pregnancy
3164 and risk of spontaneous abortion. **Canadian Medical Association Journal**,
3165 189, E625–33, 2017. doi: 10.1503/cmaj.161020.

3166 MUDAU, M., PETERS, RP., DE VOS, L., OLIVIER, DH., J. DAVEY, D.,
3167 MKWANAZI, ES., MCINTYRE, JA., KLAUSNER, JD., MEDINA-MARINO, A.
3168 High prevalence of asymptomatic sexually transmitted infections among human
3169 immunodeficiency virus-infected pregnant women in a low-income South
3170 African community. **International Journal of STD & AIDS**, 29, 324-333, 2018.
3171 doi: 10.1177/0956462417724908.

3172 MUDRY, MD., MARTÍNEZ-FLORES, I., PALERMO, AM., CARBALLO, MA.,
3173 EGOZCUE, J., GARCÍA-CALDÉS, M. Embryoletality induced by
3174 metronidazole (MTZ) in rattus norvegicus. **Teratogenesis Carcinogenesis and**
3175 **Mutagenesis**, 21,197–205,2001. doi: 10.1002/tcm.1008.

3176 MÜLLER, M. The hydrogenosome. **The Journal of General**
3177 **Microbiology**,139, 2879-2889, 1993. doi: 10.1099/00221287-139-12-2879.

3178 MUZNY, C. A., TAMHANE, A. R., EATON, E. F., HUDAK, K., BURKHOLDER,
3179 G. A., SCHWEBKE, J. R. Incidence and predictors of reinfection with
3180 trichomoniasis based on nucleic acid amplification testing results in HIV-infected
3181 patients. **International Journal of STD & AIDS**, 30, 344-352, 2019. DOI:
3182 10.1177/0956462418807115.

3183 MUZNY, C. A., VAN GERWEN, OT. Secnidazole for Trichomoniasis in Women
3184 and Men. **Sexual Medicine Reviews**, 10,255-262, 2022. doi:
3185 10.1016/j.sxmr.2021.12.004.

3186 NATHAN, B., APPIAH, J., SAUNDERS, P., HERON, D., NICHOLS, T., BRUM,
3187 R., ALEXANDER, S., BARAITSER, P., ISON, C. Microscopy outperformed in a
3188 comparison of five methods for detecting *Trichomonas vaginalis* in symptomatic
3189 women. **International Journal of STD & AIDS**, v. 26, n. 4, p. 251-256, 2015.
3190 DOI: 10.1177/0956462414534833

3191 NIEVAS, YR., COCERES, VM., MIDLEJ, V., DE SOUZA, W., BENCHIMOL, M.,
3192 PEREIRA-NEVES, A., VASHISHT, A.A, WOHLSCHEGEL, J.A., JOHNSON,
3193 PJ., DE MIGUEL, N. Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas*
3194 *vaginalis*: characterization and their association with cell interaction. **Cellular**
3195 **and Molecular Life Sciences**, 75, 2211-2226, 2018. doi: 10.1007/s00018-017-
3196 2726-3.

3197 NIEVAS, YR., LIZARRAGA, A., SALAS, N., CÓCERES, VM., DE MIGUEL, N.
3198 Extracellular vesicles released by anaerobic protozoan parasites: Current
3199 situation. **Cellular Microbiology**, 22, e13257, 2022. doi: 10.1111/cmi.13257.

3200 Oates, JÁ., Wood, AJJ., Mason, JW. Amiodarone. **The New England Journal**
3201 **of medicine** 316:455–466, 1987.
3202 <https://doi.org/10.1056/NEJM198702193160807>.

3203 OLMOS-ORTIZ, LM., BARAJAS-MENDIOLA, M. A., BARRIOS-RODILES, M.,
3204 CASTELLANO, L. E., ARIAS-NEGRETE, S., AVILA, E.E, CUÉLLAR-MATA, P.
3205 *Trichomonas vaginalis* exosome-like vesicles modify the cytokine profile and
3206 reduce inflammation in parasite-infected mice. **Parasite Immunology**, 39,
3207 2017. doi: 10.1111/pim.12426.

3208 ORTIZ, SFDN., VERDAN, R., FORTES, FDSA., BENCHIMOL, M. *Trichomonas*
3209 *vaginalis*: monolayer and cluster formation-ultrastructural aspects using high-
3210 resolution scanning electron microscopy. **Pathogens**, 23,12,1381, 2023. doi:
3211 10.3390/pathogens12121381.

3212 PAULISH-MILLER, T.E., AUGOSTINI, P., SCHUYLER, J.A., SMITH, W.L.,
3213 MORDECHAI, E., ADELSON, M.E., GYGAX, S.E., SECOR, W.E., HILBERT,
3214 D.W. *Trichomonas vaginalis* metronidazole resistance is associated with single
3215 nucleotide polymorphisms in the nitroreductase genes ntr4 Tv and ntr6 Tv.
3216 Antimicrob. Agents Chemother. 58, 2938–2943, 2014.
3217 <https://doi.org/10.1128/AAC.02370-13>.

3218 PEREIRA-NEVES, A., BENCHIMOL, M. Phagocytosis by *Trichomonas*
3219 *vaginalis*: new insights. **Biology of the Cell**, 99, 87-101, 2007. doi:
3220 10.1042/BC20060084.

3221 PEREIRA-NEVES, A., RIBEIRO, KC., BENCHIMOL, M. Pseudocysts in
3222 trichomonads--new insights. **Protist**, 154, 313-29, 2003. doi:
3223 10.1078/143446103322454095.

3224 PEREIRA-NEVES, A., GONZAGA, L., MENNA-BARRETO, R.F, BENCHIMOL,
3225 M. Characterisation of 20S Proteasome in *Tritrichomonas foetus* and Its Role
3226 during the Cell Cycle and Transformation into Endoflagellar Form. **PLoS One**,
3227 10, 129-165, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0129165.

- 3228 PINDAK, F.F., MORA DE PINDAK, M., GARDNER, J.R. Contact independent
3229 cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis*. **Genitourinary Medicine**, 69, 35-40,
3230 1993. doi: 10.1136/sti.69.1.35.
- 3231 PINTO-MARTINEZ, A., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, V., RODRÍGUEZ-DURÁN,
3232 J., HEJCHMAN, E., BENAÏM, G. Anti-*Trypanosoma cruzi* action of a new
3233 benzofuran derivative based on amiodarone structure. **Experimental**
3234 **Parasitology**, 189:8–15, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.04.0107>.
- 3235 PRINCIPE, S., HUI, A. B., BRUCE, J., SINHA, A., LIU, F.F., KISLINGER, T.
3236 Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer:
3237 implications for tumor biology and biomarker discovery. **Proteomics**, 13,1608-
3238 23, 2013. doi: 10.1002/pmic.201200533.
- 3239 QUEIROZ, R. C. B., SANTOS, L. M. S., BENCHIMOL, M., DE SOUZA, W.
3240 Cytochemical localization of enzyme markers in *Tritrichomonas foetus*.
3241 **Parasitology Research**, 77, 561-566, 1991. doi: 10.1007/BF00931013.
- 3242 RADA, P., HRDÝ, I., ZDRHA, A., NARAYANASAMY, RK., SMUTNÁ, T.,
3243 HORÁČKOVÁ, J., HARANT, K., BENEŠ, V., ONG, SC., TSAI, CY., LUO, HW.,
3244 CHIU, CH., TANG, P., TACHEZY, J. Double-Stranded RNA viruses are
3245 released from *Trichomonas vaginalis* inside small extracellular vesicles and
3246 modulate the exosomal cargo. **Frontiers in Microbiology**, 4; 13:893692, 2022.
3247 doi: 10.3389/fmicb.2022.893692.
- 3248 RADA, P., KELLEROVÁ, P., VERNER, Z., TACHEZY, J. Investigation of the
3249 Secretory Pathway in *Trichomonas vaginalis* Argues against a Moonlighting
3250 Function of Hydrogenosomal Enzymes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**,
3251 66, 899-910, 2019. doi: 10.1111/jeu.12741.
- 3252 RAI, AK., JOHNSON, PJ. *Trichomonas vaginalis* extracellular vesicles are
3253 internalized by host cells using proteoglycans and caveolin-dependent
3254 endocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 22,116,
3255 21354-21360, 2019. doi: 10.1073/pnas.1912356116.
- 3256 RAPOSO, G., STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes,
3257 microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, 8, 200, 373-83, 2013. doi:
3258 10.1083/jcb.201211138.
- 3259 RASOLOSON, D., VANACOVA, S., TOMKOVA, E., RAZGA, J., HRDY, I.,
3260 TACHEZY, J., KULDA, J. Mechanisms of in vitro development of resistance to
3261 metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. **Microbiology (Reading)**, 148, 2467-
3262 2477, 2002. doi: 10.1099/00221287-148-8-2467.
- 3263 RASMUSSEN, S. E., NIELSEN, M. H., LIND, I., RHODES, J.M. Morphological
3264 studies of the cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis* to normal human vaginal

- 3265 epithelial cells *in vitro*. **Genitourinary Medicine**, 62, 240-246, 1986. doi:
3266 10.1136/sti.62.4.240.
- 3267 REERS, M., SMITH, T.W., CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine
3268 as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**,
3269 4480–4486, 1991. <https://doi.org/10.1021/bi00232a015>.
- 3270 REIN, M.F. Trichomoniasis. **Hunter's tropical medicine, and emerging**
3271 **infectious diseases**, 731–733, 2020. doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-
3272 8.00100-9.
- 3273 RIBEIRO, K.C., BENCHIMOL, M., FARINA, M. Contribution of cryofixation and
3274 freeze-substitution to analytical microscopy: a study of *Tritrichomonas foetus*
3275 hydrogenosomes. **Microscopy Research and Technique**, 53, 87-92, 2001.
- 3276 RIBEIRO, K.C., MARIANTE, R.M., COUTINHO, L.L., BENCHIMOL, M. Nucleus
3277 behavior during the closed mitosis of *Tritrichomonas foetus*. **Biology of the**
3278 **Cell**, 94, 289- 301, 2002a. doi: 10.1016/s0248-4900(02)01206-6.
- 3279 RIBEIRO, K.C., MONTEIRO-LEAL, L.H., BENCHIMOL, M. Contributions of the
3280 axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and
3281 *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 47, 481-492,
3282 2000. doi: 10.1111/j.1550-7408. 2000.tb00077. x.
- 3283 RIBEIRO, K.C., PEREIRA-NEVES, A., BENCHIMOL, M. The mitotic spindle
3284 and associated membranes in the closed mitosis of trichomonads, **Biology of**
3285 **the Cell**, 94, 157-172, 2002b. doi: 10.1016/s0248-4900(02)01191-7.
- 3286 RIBEIRO, AS., SILVA, MV., GUERRA, PG., SAICK, KW., ULIANA, MP., Loss,
3287 R. Risco potencial do uso de medicamentos durante a gravidez e a lactação.
3288 **Infarma**, 25, 63–68, 2013. doi: 10.14450/2318-9312.v25. e1. a2013.pp62-67.
- 3289 ROBINSON, S. C. Trichomonal vaginitis resistant to metranidazole. **Canadian**
3290 **Medical Association Journal**, 86, 665, 1962.
- 3291 ROSA, I., EINICKER-LAMAS, M., RONEY BERNARDO, R., PREVIATTO, L.
3292 M., MOHANA-BORGES, R., MORGADO-DIAZ, J. A., BENCHIMOL, M.
3293 Cardiolipin in hydrogenosomes: evidence of symbiotic origin. **Eukaryotic Cell**,
3294 5, 784-787, 2006. doi: 10.1128/EC.5.4.784-787.2006. PMID: 16607026.
- 3295 ROCHA D. A., DE ANDRADE, R. I., DE SOUZA, W. BENCHIMOL, M.
3296 Evaluation of the effect of miltefosine on *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology**
3297 **Research**, 113, 1041–1047, 2014a. doi: 10.1007/s00436-013-3738-z.
- 3298 ROCHA, D.A., DE ANDRADE, R. I., URBINA, J. A., DE SOUZA, W.,
3299 BENCHIMOL, M. The effect of 3-(biphenyl-4-yl) -3-hydroxyquinuclidine (BPQ-
3300 OH) and metronidazole on *Trichomonas vaginalis*: a comparative study.

3301 **Parasitology Research**,113, 2185–2197, 2014b. doi: 10.1007/s00436-014-
3302 3871-3.

3303 ROSA, I. A., ROCHA, D. A., DE SOUZA, W., URBINA, J. A., BENCHIMOL, M.
3304 Ultrastructural alterations induced by Δ (24(25)) -sterol methyltransferase
3305 inhibitors on *Trichomonas vaginalis*. **FEMS Microbiology Letters**, 315, 72–78,
3306 2011. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02178. x.

3307 RIBEIRO, K. C., MONTEIRO-LEAL, L. H., BENCHIMOL, M. Contributions of the
3308 axostyle and flagella to the closed mitosis of *Tritrichomonas foetus* and
3309 *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 47, 481-492,
3310 2000. doi: 10.1111/j.1550-7408.2000.tb00077.x.

3311 ROWLEY, J.; HOORN, S. V; KORENROMP, E.; LOW, N.; UNEMO, M.;
3312 ABURADDAD, L. J.; CHICO, R. M.; SMOLAK, A.; NEWMAN, L.; GOTTLIEB,
3313 S.; THWIN, S. S.; BROUTET, N.; TAYLOR, M. M. Chlamydia, gonorrhoea,
3314 trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016.
3315 **Bulletin of the World Health Organization**, 97, 548, 2019. doi:
3316 10.2471/BLT.18.228486.

3317 RUSTOM, A. SAFFRICH, R.; MARKOVIC, I.; WALTHER, P.; GERDES, H.
3318 Nanotubular highways for intercellular organelle transport. **Science**, 303, 1007-
3319 1010, 2004. doi: 10.1126/science.1093133.

3320 RYU, J. S., CHOI, H. K., MIN, D. Y., HA, S. E., AHN, M. H. Effect of iron on the
3321 virulence of *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Parasitology**, 87, 457-460,
3322 2001. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[0457: EOIO TV]2.0.CO;2.

3323 SABATKE, B., GAVINHO, B., COCERES, V., DE MIGUEL, N., RAMIREZ, MI.
3324 Unveiling the role of EVs in anaerobic parasitic protozoa. **Molecular**
3325 **Immunology**, 133:34-43, 2021. doi: 10.1016/j.molimm.2021.02.007.

3326 SAHIN, L., NALLANI, SC., TASSINARI, MS. Medication use in pregnancy and
3327 the pregnancy and lactation labeling rule. **Clinical Pharmacology &**
3328 **Therapeutics**, 100, 23–25, 2016. doi: 10.1002/cpt.380.

3329 SAITO-NAKANO, Y., UMEKI, Y., SHIMOKAWA, C., KOBAYASHI, K.,
3330 HASHIMOTO, K., TAKADA, T., MAKII, C., HASEBE, R., YOSHIDA, Y.,
3331 NAKAJIMA, R., KOBAYASHI, S., HISAEDA, H. Prevalence and metronidazole
3332 resistance of *Trichomonas vaginalis* among Japanese women in 2021. **IJID**
3333 **Regions**, 7,130-135, 2023. doi: 10.1016/j.ijregi.2023.02.007.

3334 SALAS, N., BLASCO PEDREROS, M., DOS SANTOS, MELO, T., MAGUIRE,
3335 VG., SHA, J., WOHLSCHLEGEL, JA., PEREIRA-NEVES, A., DE MIGUEL, N.
3336 Role of cytoneme structures and extracellular vesicles in *Trichomonas vaginalis*
3337 parasite-parasite communication. **eLife**, 2,12: e86067, 2023. doi:
3338 10.7554/eLife.86067.

3339 SASS, G., MADIGAN, RT., JOUBERT, LM., BOZZI, A., SAYED, N., WU, JC.,
 3340 STEVENS, DA. A combination of itraconazole and amiodarone is highly effective
 3341 against *Trypanosoma cruzi* infection of human stem cell-derived
 3342 cardiomyocytes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**
 3343 101,383–391, 2019. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0023>.

3344 SCHNEIDER, A., CHATTERJEE, S., BOUSIGES, O., SELVI, B.R.,
 3345 SWAMINATHAN, A., CASSEL, R., BOUTILLIER, A.L. Acetyltransferases
 3346 (HATs) as targets for neurological therapeutics. **Neurotherapeutics**, 10, 568–
 3347 588, 2013. doi: 10.1007/s13311-013-0204-7.

3348 SCHWEBKE, J. R.; GAYDOS, C. A.; DAVIS, T.; MARRAZZO, J.;
 3349 FURGERSON, D.; TAYLOR, S. N.; SMITH, B.; BACHMANN, L. H.;
 3350 ACKERMAN, R.; SPURRELL, T.; FERRIS, D.; BURNHAM, C. A.; RENO, H.;
 3351 LEBED, J.; EISENBERG, D.; KERNDT, P.; PHILIP, S.; JORDAN, J.; QUIGLEY,
 3352 N. Clinical evaluation of the Cepheid Xpert TV assay for detection of
 3353 *Trichomonas vaginalis* with prospectively collected specimens from men and
 3354 women. **Journal of Clinical Microbiology**, 56, 2, e01091-17, 2018. DOI:
 3355 10.1128/JCM.01091-17.

3356 SECOR, WE. *Trichomonas vaginalis*: treatment questions and challenges.
 3357 **Expert Review of Ant-Infective Therapy** 10, 107–109, 2012. doi:
 3358 10.1586/eri.11.159.

3359 SERRANO-MARTÍN, X., GARCÍA-MARCHAN, Y., FERNANDEZ, A.,
 3360 RODRIGUEZ, N., ROJAS, H., VISBAL, G., BENAİM, G. Amiodarone
 3361 destabilizes intracellular Ca^{2+} homeostasis and biosynthesis of sterols in
 3362 *Leishmania mexicana*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 53,1403–
 3363 1410, 2009a. <https://doi.org/10.1128/AAC.01215-08>

3364 SERRANO-MARTÍN, X., PAYARES, G., DE LUCCA, M., MARTINEZ, JC.,
 3365 MENDOZA LEÓN, A., BENAİM, G. Amiodarone and miltefosine act
 3366 synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological
 3367 cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and**
 3368 **Chemotherapy**, 53,5108–5113, 2009b. <https://doi.org/10.1128/AAC.00505-09>

3369 SHEELE, J. M.; CRANDALL, C. J. ARKO, B. L.; VALLABHANENI, M.; DUNN,
 3370 C. T.; CHANG, B. F.; FANN, P.; BIGACH, M. The OSOM® *Trichomonas* Test is
 3371 unable to accurately diagnose *Trichomonas vaginalis* from urine in men. **The**
 3372 **American Journal of Emergency Medicine**, 37, 5, 1002-1003, 2019. doi:
 3373 10.1016/j.ajem.2018.10.022.

3374 SILVA FILHO, F.C., DE SOUZA, W. The interaction of *Trichomonas vaginalis*
 3375 and *Tritrichomonas foetus* with epithelial cells *in vitro*. **Cell**
 3376 **Structure and Function**,13, 301-310, 1988. doi: 10.1247/csf.13.301.

- 3377 SIMPSON, C.F. e WHITE, F.H. Structure of *Trichomonas foetus* as revealed by
3378 electron microscopy. **American Journal of Veterinary Research**, 66, 815-825,
3379 1964.
- 3380 SINGH, B.N., HAYES, G.R., LUCAS, J.J., BEACH, D.H., GILBERT, R.O.
3381 *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial
3382 cells. **Infection and Immunity**, 72, 4151-4158, 2004. doi:
3383 10.1128/IAI.72.7.4151-4158.2004.
- 3384 SINGH, B.N., HAYES, G.R., LUCAS, J.J., BEACH, D.H., GILBERT, R.O. *In*
3385 *vitro* cytopathic effects of a cysteine protease of *Tritrichomonas foetus* on
3386 cultured bovine uterine epithelial cell. **American Journal of Veterinary**
3387 **Research**, 66, 1185-1186, 2005. doi: 10.2460/ajvr.2005.66.1181.
- 3388 SINGH, B.N., LUCAS, J.J., BEACH, D.H., SHIN, S.T., GILBERT, R.O.
3389 Adhesion of *Tritrichomonas foetus* to bovine epithelial cells. **Infection and**
3390 **Immunity**, 67, 3847-3854, 1999. doi: 10.1128/IAI.67.8.3847-3854.1999.
- 3391 SHENNAN, A., CRAWSHAW, S., BRILEY, A., HAWKEN, J., SEED, P., JONES,
3392 G., POSTON L. A randomised controlled Trial of metronidazole for the
3393 prevention of preterm birth in women positive for cervicovaginal fetal fibronectin:
3394 the PREMET Study. **International Journal of Obstetrics & Gynaecology**,
3395 113,65–74, 2006. doi: 10.1111/j.1471-0528.2005.00788. x.
- 3396 SMITH, R. W., BRITTINGHAM, A., WILSON, W.A. Purification and identification
3397 of amylases released by the human pathogen *Trichomonas vaginalis* that are
3398 active towards glycogen. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 210, n.
3399 1-2, p. 22- 31, 2016. doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.08.002.
- 3400 SUITCLIFFE, S., ALDERETE, J.F., TILL, C., GOODMAN, P.J., HSING, A.W.,
3401 ZENILMAN, J.M., DE MARZO, A.M., PLATZ, E. A. Trichomonosis and
3402 subsequent risk of prostate cancer in the prostate cancer prevention trial.
3403 **International Journal of Cancer**, 124, 2082–2087, 2009. [https://doi.](https://doi.org/10.1002/ijc.24144)
3404 [org/10.1002/ijc.24144](https://doi.org/10.1002/ijc.24144).
- 3405 SUTCLIFFE, S., GIOVANNUCCI, E., ALDERETE, JF., CHANG, TH., GAYDOS,
3406 CA., ZENILMAN, JM., DE MARZO, AM., WILLETT, WC., PLATZ, E.A. Plasma
3407 antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate
3408 cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 15, 939-45, 2006.
3409 doi: 10.1158/1055-9965.
- 3410 SWYGARD, H., MILLER, W. C., KAYDOS-DANIELS, S. C., COHEN, M.S.,
3411 LEONE, P.A., HOBBS, M. M., SENA, A.C. Targeted screening for *Trichomonas*
3412 *vaginalis* with culture using a two-step method in women presenting for STD
3413 evaluation. **Sexually Transmitted Diseases**, 31, 659–664, 2004. doi:
3414 10.1097/01.olq.0000143091.95094.

3415 SZEMPRUCH, A. J.; SYKES, S. E.; KIEFT, R.; DENNISON, L.; BECKER, A. C.;
 3416 GARTRELL, A.; MARTIN, W. J.; NAKAYASU, E. S.; ALMEIDA, I. C.; HAJDUK,
 3417 S. L.; HARRINGTON, J. M. Extracellular vesicles from *Trypanosoma brucei*
 3418 mediate virulence factor transfer and cause host anemia. **Cell**, 164, 246-257,
 3419 2016. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.051.

3420 TACHEZY, J., MAKKI, A., HRDÝ, I. The hydrogenosome of *Trichomonas*
 3421 *vaginalis*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 69, e12922, 2022. doi:
 3422 10.1111/jeu.12922.

3423 THÉRY, C., REGNAULT, A., GARIN, J., WOLFERS, J., ZITVOGEL, L.,
 3424 RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., RAPOSO, G., AMIGORENA, S. Molecular
 3425 characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of
 3426 the heat shock protein hsc73. **Journal of Cell Biology**, 1, 147, 599-610, 1999.
 3427 doi: 10.1083/jcb.147.3.599.

3428 THÉRY, C., WITWER, KW., AIKAWA, E., ALCARAZ, MJ., ANDERSON, JD.,
 3429 ANDRIANTSITOHAINA, R., ANTONIOU, A., ARAB, T., ARCHER, F., ATKIN-
 3430 SMITH, GK., AYRE, DC., BACH, JM., BACHURSKI, D., BAHARVAND, H.,
 3431 BALAJ, L., BALDACCHINO, S., BAUER, NN., BAXTER, AA., BEBAWY, M.,
 3432 BECKHAM, C., BEDINA ZAVEC, A., BENMOUSSA, A., BERARDI, AC.,
 3433 BERGESE, P., BIELSKA, E., BLENKIRON, C., BOBIS-WOZOWICZ, S.,
 3434 BOILARD, E., BOIREAU, W., BONGIOVANNI, A., BORRÀS, F.E., BOSCH, S.,
 3435 BOULANGER, CM., BREAKFIELD, X., BREGLIO, AM., BRENNAN, MÁ.,
 3436 BRIGSTOCK, DR., BRISSON, A., BROEKMAN, ML., BROMBERG, JF., BRYL-
 3437 GÓRECKA, P., BUCH, S., BUCK, AH., BURGER, D., BUSATTO, S.,
 3438 BUSCHMANN, D., BUSSOLATI, B., BUZÁS, EI., BYRD, JB., CAMUSSI, G.,
 3439 CARTER, DR., CARUSO, S., CHAMLEY, LW., CHANG, YT., CHEN, C., CHEN,
 3440 S., CHENG, L., CHIN, AR., CLAYTON, A., CLERICI, SP., COCKS, A.,
 3441 COCUCCI, E., COFFEY, RJ., CORDEIRO-DA-SILVA, A., COUCH, Y.,
 3442 COUMANS, FA., COYLE, B., CRESCITELLI, R., CRIADO, MF., D'SOUZA-
 3443 SCHOREY, C., DAS, S., DATTA CHAUDHURI, A., DE CANDIA, P., DE
 3444 SANTANA, EF., DE WEVER, O., DEL PORTILLO, HA., DEMARET, T.,
 3445 DEVILLE, S., DEVITT, A., DHONDT, B., DI VIZIO, D., DIETERICH, LC., DOLO,
 3446 V., DOMINGUEZ RUBIO, AP., DOMINICI, M., DOURADO, MR., DRIEDONKS,
 3447 TA., DUARTE, FV., DUNCAN, HM., EICHENBERGER, RM., EKSTRÖM, K., EL
 3448 ANDALOUSSI, S., ELIE-CAILLE, C., ERDBRÜGGER, U., FALCÓN-PÉREZ,
 3449 JM., FATIMA, F., FISH, JE., FLORES-BELLVER, M., FÖRSÖNITS, A.,
 3450 FRELET-BARRAND, A., FRICKE, F., FUHRMANN, G., GABRIELSSON, S.,
 3451 GÁMEZ-VALERO, A., GARDINER, C., GÄRTNER, K., GAUDIN, R., GHO, YS.,
 3452 GIEBEL, B., GILBERT, C., GIMONA, M., GIUSTI, I., GOBERDHAN, DC.,
 3453 GÖRGENS, A., GORSKI, SM., GREENING, DW., GROSS, JC., GUALERZI, A.,
 3454 GUPTA, GN., GUSTAFSON, D., HANDBERG, A., HARASZTI, RA.,
 3455 HARRISON, P., HEGYESI, H., HENDRIX, A., HILL, AF., HOCHBERG, FH.,
 3456 HOFFMANN, KF., HOLDER, B., HOLTHOFER, H., HOSSEINKHANI, B., HU,

3457 G., HUANG, Y., HUBER, V., HUNT, S., IBRAHIM, AG., IKEZU, T., INAL, JM.,
 3458 ISIN, M., IVANOVA, A., JACKSON, HK., JACOBSEN, S., JAY, SM.,
 3459 JAYACHANDRAN, M., JENSTER, G., JIANG, L., JOHNSON, SM., JONES,
 3460 JC., JONG, A., JOVANOVIC-TALISMAN, T., JUNG, S., KALLURI, R., KANO,
 3461 SI., KAUR, S., KAWAMURA, Y., KELLER, ET., KHAMARI, D., KHOMYAKOVA,
 3462 E., KHVOROVA, A., KIERULF, P., KIM, KP., KISLINGER, T., KLINGEBORN,
 3463 M., KLINKE, DJ., KORNEK, M., KOSANOVIĆ, MM., KOVÁCS, ÁF., KRÄMER-
 3464 ALBERS, EM., KRASEMANN, S., KRAUSE, M., KUROCHKIN, IV., KUSUMA,
 3465 GD., KUYPERS, S., LAITINEN, S., LANGEVIN, SM., LANGUINO, LR.,
 3466 LANNIGAN, J., LÄSSER, C., LAURENT, LC., LAVIEU, G., LÁZARO-IBÁÑEZ,
 3467 E., LE LAY, S., LEE, MS., LEE, YXF., LEMOS, DS., LENASSI, M.,
 3468 LESZCZYNSKA, A., LI, IT., LIAO, K., LIBREGTS, SF., LIGETI, E., LIM, R., LIM,
 3469 SK., LINĚ, A., LINNEMANNSTÖNS, K., LLORENTE, A., LOMBARD, CA.,
 3470 LORENOWICZ, MJ., LÖRINCZ, ÁM., LÖTVALL, J., LOVETT, J., LOWRY, MC.,
 3471 LOYER, X., LU, Q., LUKOMSKA, B., LUNAVAT, TR., MAAS, SL., MALHI, H.,
 3472 MARCILLA, A., MARIANI, J., MARISCAL, J., MARTENS-UZUNOVA, ES.,
 3473 MARTIN-JAULAR, L., MARTINEZ, MC., MARTINS, VR., MATHIEU, M.,
 3474 MATHIVANAN, S., MAUGERI, M., MCGINNIS, LK., MCVEY, MJ., MECKES,
 3475 DG., JR, MEEHAN, KL., MERTENS, I., MINCIACCHI, VR., MÖLLER, A.,
 3476 MØLLER, JØRGENSEN, M., MORALES-KASTRESANA, A., MORHAYIM, J.,
 3477 MULLIER, F., MURACA, M., MUSANTE, L., MUSSACK, V., MUTH, DC.,
 3478 MYBURGH, KH., NAJRANA, T., NAWAZ, M., NAZARENKO, I., NEJSUM, P.,
 3479 NERI, C., NERI, T., NIEUWLAND, R., NIMRICHTER, L., NOLAN, JP., NOLTE-
 3480 'T HOEN, EN., NOREN HOOTEN, N., O'DRISCOLL, L., O'GRADY, T.,
 3481 O'LOGHLEN, A., OCHIYA, T., OLIVIER, M., ORTIZ, A., ORTIZ, LA.,
 3482 OSTEIKOETXEA, X., ØSTERGAARD, O., OSTROWSKI, M., PARK, J.,
 3483 PEGTEL, DM., PEINADO, H., PERUT, F., PFAFFL, MW., PHINNEY, DG.,
 3484 PIETERS, BC., PINK, RC., PISETSKY, DS., POGGE, VON STRANDMANN, E.,
 3485 POLAKOVICOVA, I., POON, IK., POWELL, BH., PRADA, I., PULLIAM, L.,
 3486 QUESENBERRY, P., RADEGHIERI, A., RAFFAI, RL., RAIMONDO, S., RAK,
 3487 J., RAMIREZ, MI., RAPOSO, G., RAYYAN, MS., REGEV-RUDZKI, N.,
 3488 RICKLEFS, FL., ROBBINS, PD., ROBERTS, DD., RODRIGUES, SC., ROHDE,
 3489 E., ROME, S., ROUSCHOP, KM., RUGHETTI, A., RUSSELL, AE., SAÁ, P.,
 3490 SAHOO, S., SALAS-HUENULEO, E., SÁNCHEZ, C., SAUGSTAD, JA., SAUL,
 3491 MJ., SCHIFFELERS, RM., SCHNEIDER, R., SCHØYEN, TH., SCOTT, A.,
 3492 SHAHAJ, E., SHARMA, S., SHATNYEVA, O., SHEKARI, F., SHELKE, GV.,
 3493 SHETTY, AK., SHIBA, K., SILJANDER, PR., SILVA, AM., SKOWRONEK, A.,
 3494 SNYDER, OL., SOARES, RP., SÓDAR, BW., SOEKMADJI, C., SOTILLO, J.,
 3495 STAHL, PD., STOORVOGEL, W., STOTT, SL., STRASSER, EF., SWIFT, S.,
 3496 TAHARA, H., TEWARI, M., TIMMS, K., TIWARI, S., TIXEIRA, R., TKACH, M.,
 3497 TOH, WS., TOMASINI, R., TORRECILHAS, AC., TOSAR, JP., TOXAVIDIS, V.,
 3498 URBANELLI, L., VADER, P., VAN BALKOM, BW., VAN DER GREIN, SG., VAN
 3499 DEUN, J., VAN HERWIJNEN, MJ., VAN, KEUREN-JENSEN, K., VAN NIEL, G.,
 3500 VAN ROYEN, ME., VAN WIJNEN, AJ., VASCONCELOS, MH., VECHETTI, IJ.,

3501 JR., VEIT, TD., VELLA, LJ., VELOT, É., VERWEIJ, FJ., VESTAD, B., VIÑAS,
3502 JL., VISNOVITZ, T., VUKMAN, KV., WAHLGREN, J., WATSON, DC.,
3503 WAUBEN, MH., WEAVER, A., WEBBER, JP., WEBER, V., WEHMAN, AM.,
3504 WEISS, DJ., WELSH, JA., WENDT, S., WHELOCK, AM., WIENER, Z.,
3505 WITTE, L., WOLFRAM, J., XAGORARI, A., XANDER, P., XU, J., YAN, X.,
3506 YÁÑEZ-MÓ, M., YIN, H., YUANA, Y., ZAPPULLI, V., ZARUBOVA, J., ŽEKAS,
3507 V., ZHANG, JY., ZHAO, Z., ZHENG, L., ZHEUTLIN, AR., ZICKLER, AM.,
3508 ZIMMERMANN, P., ZIVKOVIC, AM., ZOCCO, D., ZUBA-SURMA, EK. Minimal
3509 information for studies of extracellular vesicles 2018 (misev2018): a position
3510 statement of the international society for extracellular vesicles and update of the
3511 misev2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**. 23,7, 1535750,
3512 2018. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.

3513 THIÉRY, J.P. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en
3514 microscopie électronique. **Journal of Microscopic** 6, 987- 1018,1967.

3515 THOMPSON, K., NEWCOMB, DL., MOFFAT, GJ., ZALIKOWSKI, J.,
3516 CHELLMAN, GJ., MCNERNEY, ME. Evaluation of early fetal exposure to
3517 vaginally-administered- metronidazole in pregnant cynomolgus monkeys.
3518 **ReproductivenToxicology**, 59,17–21,2016. doi:
3519 10.1016/j.reprotox.2015.10.013.

3520 TORRECILHAS, AC., SOARES, RP., SCHENKMAN, S., FERNÁNDEZ-
3521 PRADA, C., OLIVIER, M. Extracellular vesicles in Trypanosomatids: Host Cell
3522 Communication. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 10,
3523 602502,2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.602502.

3524 TWU, O., DE MIGUEL, N., LUSTIG, G., STEVENS, G. C., VASHISHT, A. A.,
3525 WOHLSCHLEGEL, J.A., JOHNSON, PJ. *Trichomonas vaginalis* exosomes
3526 deliver cargo to host cells and mediate host:parasite interactions. **PLOS**
3527 **Pathogens**, 9, 1003482, 2013. doi: 10.1371/journal.ppat.1003482.

3528 UPCROFT, JA., DUNN, LA., WAL, T., TABRIZI, S., DELGADILLO-CORREA,
3529 MG., JOHNSON, PJ., GARLAND, S., SIBA, P., UPCROFT, P. Metronidazole
3530 resistance in *Trichomonas vaginalis* from highland women in Papua New
3531 Guinea. **Sex Health**, 6, 334-8, 2009. doi: 10.1071/SH09011.

3532 UPCROFT, P., UPCROFT, JA. Drug targets and mechanisms of resistance in
3533 the anaerobic protozoa. **Clinical Microbiology Reviews**, 14, 150-64, 2001. doi:
3534 10.1128/CMR.14.1.150-164.2001.

3535 VAN GERWEN, OT., OPSTEEN, SA., GRAVES, KJ., MUZNY, CA. **Infectious**
3536 **Disease Clinics of North America**, 37, 245-265, 2023. doi:
3537 10.1016/j.idc.2023.02.001.

- 3538 VAN HOOGEVEST, P., WENDEL, A. The use of natural and synthetic
3539 phospholipids as pharmaceutical excipients. **European Journal of Lipid**
3540 **Science and Technology**, 116,1088-1107, 2014. doi: 10.1002/ejlt.201400219.
- 3541 VEIGA-SANTOS, P., BARRIAS, ES., SANTOS, JF., DE BARROS MOREIRA,
3542 TL., DE CARVALHO, TM., URBINA, JÁ., DE SOUZA, W. Effects of amiodarone
3543 and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*.
3544 **International Journal of Antimicrobial Agents**, 40,61–71, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.03.009>.
3545
- 3546 VEIGA-SANTOS, P., LI, K., LAMEIRA, L., DE CARVALHO, T.M.U., HUANG,
3547 G., GALIZZI, M., SHANG, N., LI, Q., GONZALEZ-PACANOWSKA, D.,
3548 HERNANDEZ-RODRIGUEZ, V., BENAÏM, G., GUO, R.-T., URBINA, J.A., DO
3549 CAMPO, R., DE SOUZA, W., OLDFIELD, E. 2015. SQ109, a new drug lead for
3550 chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 59, 1950–1961,
3551 2015. <https://doi.org/10.1128/AAC.03972-14>.
- 3552 VICENTE, D., PÉREZ-TRALLERO, E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol.
3553 **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 28,122–130, 2010. doi:
3554 10.1016/j.eimc.2009.10.002.
- 3555 VILELA, R., MENNA BARRETO, R.F., BENCHIMOL, M. Methyl jasmonate
3556 induces cell death and loss of hydrogenosomal membrane potential in
3557 *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology International**, 3, 387–393, 2010.
3558 <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.05.003>.
- 3559 VISCOGLIOSI, E., BRUGEROLLE, G. Cytoskeleton in trichomonads III: study
3560 of the morphogenesis during division by using monoclonal antibodies against
3561 cytoskeleton structures. **European Journal of Protistology**, 30,129-138,
3562 1994a. doi: 10.1016/S0932-4739(11)80269-5.
- 3563 VISCOGLIOSI, E., BRUGEROLLE, G. Striated fibers in trichomonads: costa
3564 proteins represent a new class of proteins forming striated roots. **Cell Motility**
3565 **and the Cytoskeleton**., 29, 82-93, 1994b. doi: 10.1002/cm.970290108.
- 3566 WAGENLEHNER, FM., BROCKMEYER, NH., DISCHER, T., FRIESE, K.,
3567 WICHELHAUS, TA. The Presentation, diagnosis, and treatment of sexually
3568 transmitted infections. **Deutsches Ärzteblatt International**, 11,113,11-22,
3569 2016. doi: 10.3238/arztebl.2016.0011.
- 3570 WATT, L., JENNISON, RF. Clinical evaluation of metronidazole. A new
3571 systemic trichomonacide. **British Journal of Sports Medicine**, 24,2,902-5,
3572 1960. doi: 10.1136/bmj.2.5203.902.
- 3573 WORKOWSKI, K. A. Centers for Disease Control and Prevention sexually
3574 transmitted diseases treatment guidelines. **Clinical Infectious Diseases**, 61,
3575 suppl_8, p. S759-S762, 2015.

3576 **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Global health sector strategy on sexually
 3577 transmitted infections (2016-2021). **PLoS One**, 4,17, e0263550, 2022. doi:
 3578 10.1371/journal.pone.0263550.

3579 WRIGHT, JM., WEBB, RI., O'DONOGHUE, P., UPCROFT, P., UPCROFT, JA.
 3580 Hydrogenosomes of laboratory-induced metronidazole-resistant *Trichomonas*
 3581 *vaginalis* lines are downsized while those from clinically metronidazole-resistant
 3582 isolates are not. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 57,171-6, 2010. doi:
 3583 10.1111/j.1550-7408.2009.00455. x.

3584 YARLETT, N., YARLETT, N.C., E LLOYD, D. Metronidazole-resistant clinical
 3585 isolates of *Trichomonas vaginalis* have lowered oxygen affinities. **Molecular**
 3586 **and Biochemical Parasitology**, 19, 111–116, 1986. doi: 10.1016/0166-
 3587 6851(86)90115-5.

3588 YAMASHITA, Y. M.; INABA, M.; BUSZCZAK, M. Specialized intercellular
 3589 communications via cytonemes and nanotubes. **Annual Review of Cell and**
 3590 **Developmental Biology**, 34, 59-84, 2018. doi: 10.1146/annurev-cellbio100617-
 3591 062932.

3592 ZHANG, K., BEVERLEY, S.M. Phospholipid and sphingolipid metabolism
 3593 in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 170, 55–64, 2010.
 3594 doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.12.004.

3595 ZHANG, B., LI, J., YANG, X., WU, L., ZHANG, J., YANG, Y., ZHAO, Y.,
 3596 ZHANG, L., YANG, X., YANG, X., CHENG, X., LIU, Z., JIANG, B., JIANG, H.,
 3597 GUDDAT, LW., YANG, H., RAO, Z. Crystal structures of membrane transporter
 3598 MmpL3, an Anti-TB Drug Target. **Cell**, 24,176(3):636-648.e13, 2019. doi:
 3599 10.1016/j.cell.2019.01.003.

3600

3601 **Anexo 1**

3602 **Anexo 2**

3603



Effects of amiodarone, amioder, and dronedarone on *Trichomonas vaginalis*

Tatiana Guinancio de Souza^{1,2} · Gustavo Benaim^{3,4} · Wanderley de Souza^{2,5} · Marlene Benchimol^{1,2,5} 

Received: 15 November 2021 / Accepted: 26 March 2022 / Published online: 18 April 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Trichomonas vaginalis is a protozoan that causes human trichomoniasis, the most common non-viral sexually transmitted infection (STI) affecting approximately 278 million people worldwide. The current treatment for trichomoniasis is based on 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole, known as metronidazole (MTZ). Although effective in clearing the parasite infection, MTZ is related to provoking severe side effects, and it is not recommended during pregnancy. In addition, some strains present resistance to 5'-nitroimidazoles, making urgent the development of alternative drugs for trichomoniasis. Amiodarone, an antiarrhythmic drug, exerts a significant anti-parasite effect, mainly due to its interference with calcium homeostasis and the biosynthesis of sterols. Therefore, we decided to test the effect of amiodarone and two other related compounds (amioder and dronedarone) on *T. vaginalis*. Our observations show that amiodarone stimulated, rather than inhibited, parasite growth, induced cell aggregation, and glycogen accumulation. Furthermore, the other two compounds displayed anti-parasite activity with IC₅₀ of 3.15 and 11 μ M, respectively, and the apoptosis-like process killed the cells. In addition, cells exhibited morphological changes, including an effect on hydrogenosomes structure.

Keywords Chemotherapy · Trichomoniasis · Amiodarone · Amioder · Dronedarone

Introduction

Trichomonas vaginalis is a protozoan that causes human trichomoniasis, the most common non-viral sexually transmitted infection (STI) affecting approximately 278 million people worldwide (WHO 2012). Pregnant women with trichomoniasis may present miscarriage, premature birth,

premature rupture of the placenta, and disorders in pregnancy (Petrin et al. 1998). The disease can also cause infertility (Lewis 2010; Mielczarek and Blaszkowska 2016). In men, the disease is usually asymptomatic. However, it can lead to inflammation in the urethra and prostate in more severe cases (Rein 1990). Infection by *T. vaginalis* is also related to a greater predisposition to infections caused by the human papillomavirus (HPV) (Noël et al. 2010), also the human immunodeficiency virus (HIV) (van der Pol et al. 2008), and cervical and prostate cancer (Sutcliffe 2006).

The current treatment for human trichomoniasis is based on 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole, a drug known as metronidazole (MTZ). It is a compound widely used to treat several infections caused by bacteria (*Helicobacter*, *Bacteroides*, and *Clostridium*) and anaerobic parasites such as *Trichomonas*, *Entamoeba*, and *Giardia* (Edwards 1993). Although effective to clear most parasite infections, this medicine is related to severe side effects, such as nausea, vomiting, dizziness, and insomnia (Rosa et al. 2011). In the most severe cases, it may cause leukopenia and neuropathies. Furthermore, this treatment cannot be used during pregnancy (Lossick 1990). Besides its toxicity, some strains are resistant to 5'-nitroimidazoles

Section Editor: Bradford S. McGwire

✉ Marlene Benchimol
marlenebenchimol@gmail.com

¹ Universidade Do Grande Rio, Duque de Caxias, Brazil

² Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal Do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco G, Rio de Janeiro, Brazil

³ Instituto de Estudios Avanzados, Caracas, Venezuela

⁴ Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

⁵ Centro Nacional de Biología Estrutural E Bioimagens, Universidade Federal Do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

(Paulish-Miller et al. 2014). Thus, the development of new alternative drugs for trichomoniasis is necessary.

Amiodarone is an antiarrhythmic drug approved in the USA in 1985 and used in atrial fibrillation (Oates et al. 1987). Dronedarone, a benzofuran analog of amiodarone, lacks the iodine component found in amiodarone, considered to be largely responsible for the multiple organ toxicities of this compound. The FDA has also approved dronedarone. Both are cationic lipophilic benzofurans. In addition, this antiarrhythmic agent and its derivatives present antiparasitic effects, disturbing Ca^{2+} homeostasis in *Trypanosoma cruzi* (Adesse et al. 2011; Benaim et al. 2006; Veiga-Santos et al. 2012) and *Leishmania* (Serrano-Martín et al. 2009a), resulting in an intracellular Ca^{2+} increase (Benaim et al. 2020). Amiodarone also interferes with the biosynthesis of ergosterol in these parasites (Benaim et al. 2006; Serrano-Martín et al. 2009b). It was also shown that dronedarone is active against these two trypanosomatid species. Amioder is a recently synthesized benzofuran derivative based on the structure of amiodarone (Hejchman et al. 2012), which has recently been shown to display a significant effect on *T. cruzi* (Pinto-Martinez et al. 2018). Recent studies have reported an effect of amioder also on *Leishmania donovani*, showing that it inhibits the growth of promastigotes and amastigotes within macrophages. This compound was also shown to disturb intracellular Ca^{2+} homeostasis in *L. donovani*, fully collapsing the mitochondrial membrane potential and, simultaneously, inducing alkalization of the acidocalcisomes of *L. donovani*, leading to the death of the parasite (Martinez-Sotillo et al. 2019). The present work investigated the in vitro effect of amiodarone, dronedarone, and amioder on *T. vaginalis*.

Materials and methods

Parasite and cell culture

To analyze drug activity against *T. vaginalis*, we used the JT strain isolated in Brazil's Hospital of Federal University of Rio de Janeiro. Trophozoites were maintained anaerobically in trypticase yeast-extract maltose (TYM) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Diamond 1957). The cells were grown for 24 h at 37 °C, corresponding to the logarithmic growth phase.

Compounds

Figure 1a–c show the structure of amiodarone, dronedarone, and amioder, respectively. Amiodarone was purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA. Dronedarone was extracted and crystallized from commercial tablets

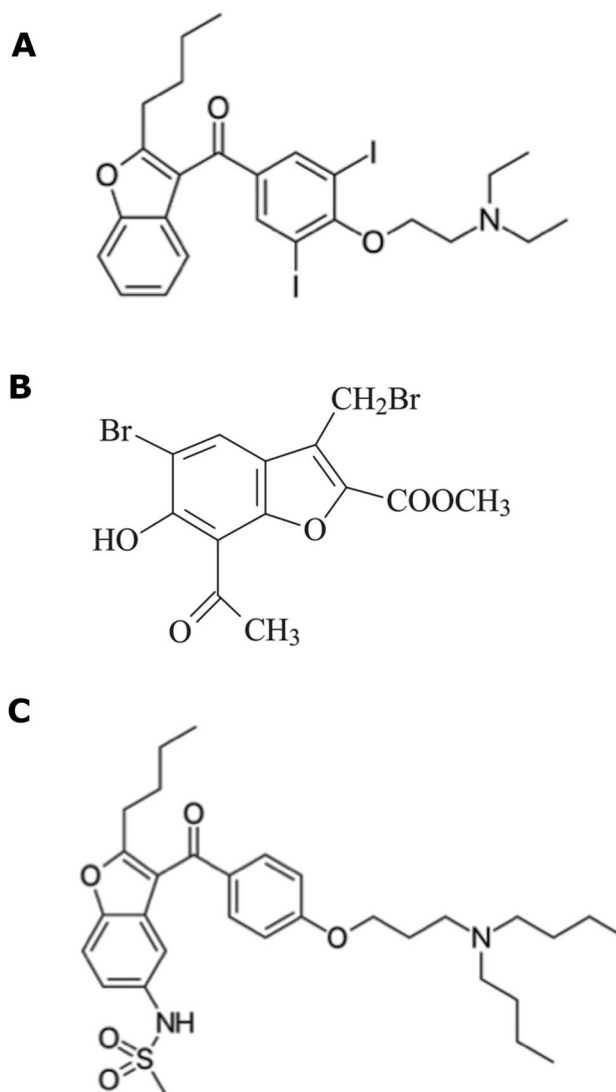


Fig. 1 Molecular chemical structure of amiodarone (a), amioder (b), and dronedarone (c)

(Multaq) (Benaim et al. 2012). The compound amioder (methyl 7-acetyl-5-Bromo-6-hydroxy-3-bromomethyl-2-benzofurancarboxylate) was kindly provided by Dr. Elżbieta Hejchman, from the Department of Organic Chemistry (Faculty of Pharmacy, The Medical University of Warsaw).

Determination of IC₅₀

To determine the drug concentration that inhibited parasite growth by 50% (IC₅₀), the percentage of growth inhibition was plotted as a function of the drug concentration, and the values were fitted in a nonlinear curve. Regression analyses were performed using the Sigma Plot 8.0

software. Data were plotted using the Graphpad Prism 6.0® software.

$$I = I_{max} \frac{C}{I_{50} + C},$$

where I is the percent (%) of inhibition, I_{max} × 100% inhibition, C is the concentration of the inhibitor, and IC_{50} is the concentration required for 50% growth inhibition.

Effect of the compounds on parasite growth

Parasites were grown to a density of 1×10^5 cells/ml. After 24 h of parasite growth, the compounds were added at different concentrations (1, 5, 10, and 20 μ M) from stock

solutions previously diluted in dimethylsulfoxide (DMSO). The final concentration of DMSO in the growth medium never exceeded 1% (v/v). Cell densities were determined using flow cytometry.

Fluorescence light microscopy

Cells were washed in PBS and fixed in 4% formaldehyde in phosphate buffer for 5 min and then placed on cover-slips previously coated with poly-L-lysine for 10 min, incubated for 5 min in 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes, USA), and diluted at 1:500. The slides were washed, mounted with Prolong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, USA), and observed

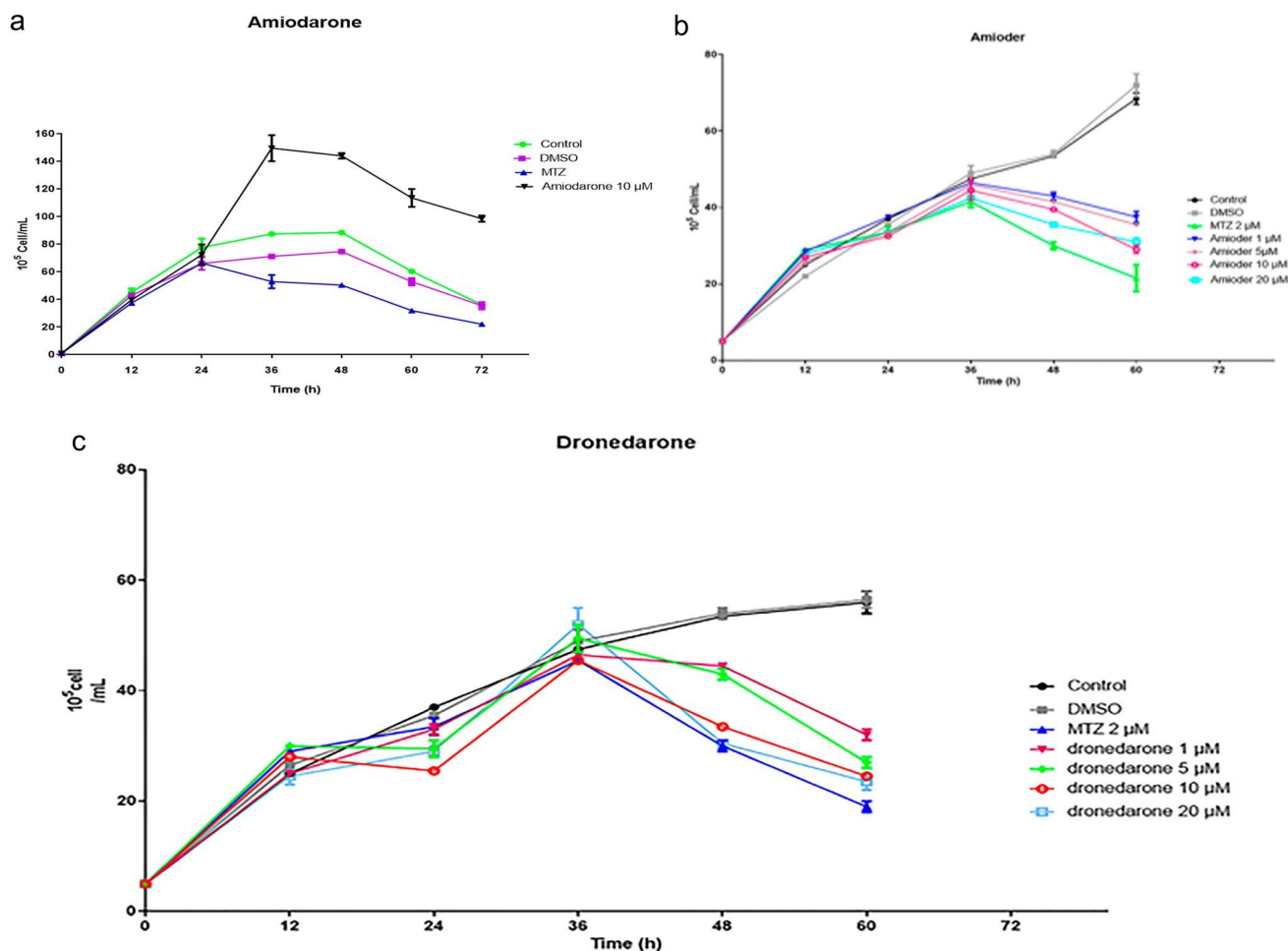
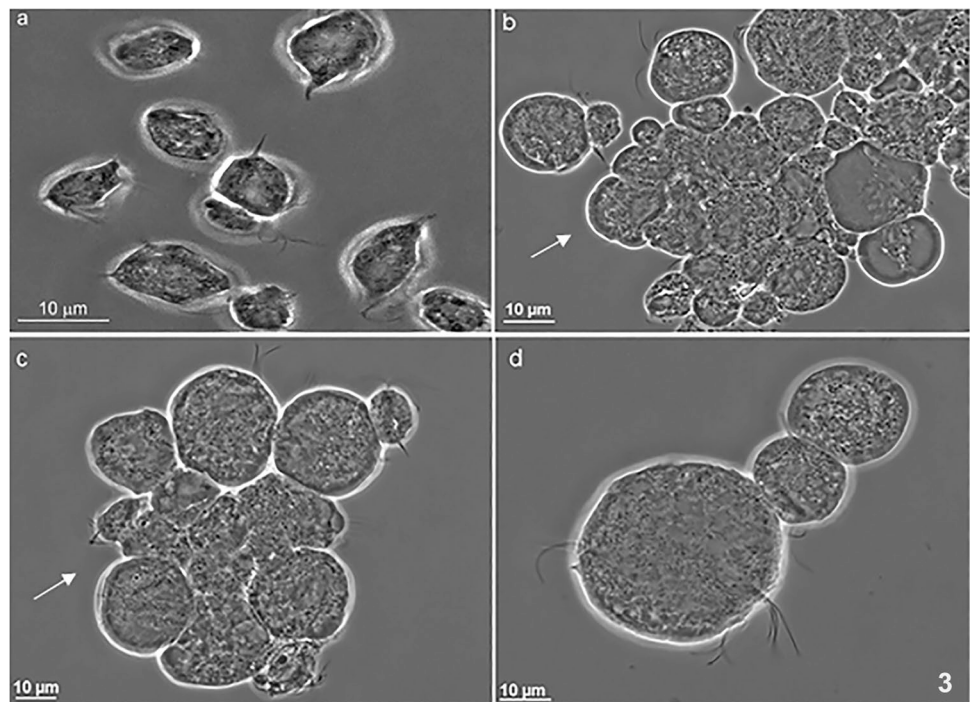


Fig. 2 **a** *T. vaginalis* control, and treated with DMSO, 10 μ M of amiodarone, and metronidazol (MTZ). Arrows indicate the time of addition of the drugs (24 h). The number of trophozoites was determined using flow cytometry. **b** *T. vaginalis* control and treated with DMSO, 1, 5, 10, and 20 μ M amioder, and 2 μ M of metronidazol (MTZ). Arrows indicate the time of addition of the drugs (12 h). The number

of trophozoites was determined using flow cytometry. **c** *T. vaginalis* control, and treated with DMSO 1, 5, 10, and 20 μ M dronedarone, and 2 μ M of metronidazol (MTZ). Arrows indicate the time of addition of the drugs (12 h). The number

Fig. 3 Phase contrast of *T. vaginalis* treated with 10 Mm amiodarone for 24 h. **a** Control with normal morphology; **b–d** cells treated with 10 μ M amiodarone for 24 h. Rounded and clustered cells (arrows) are observed

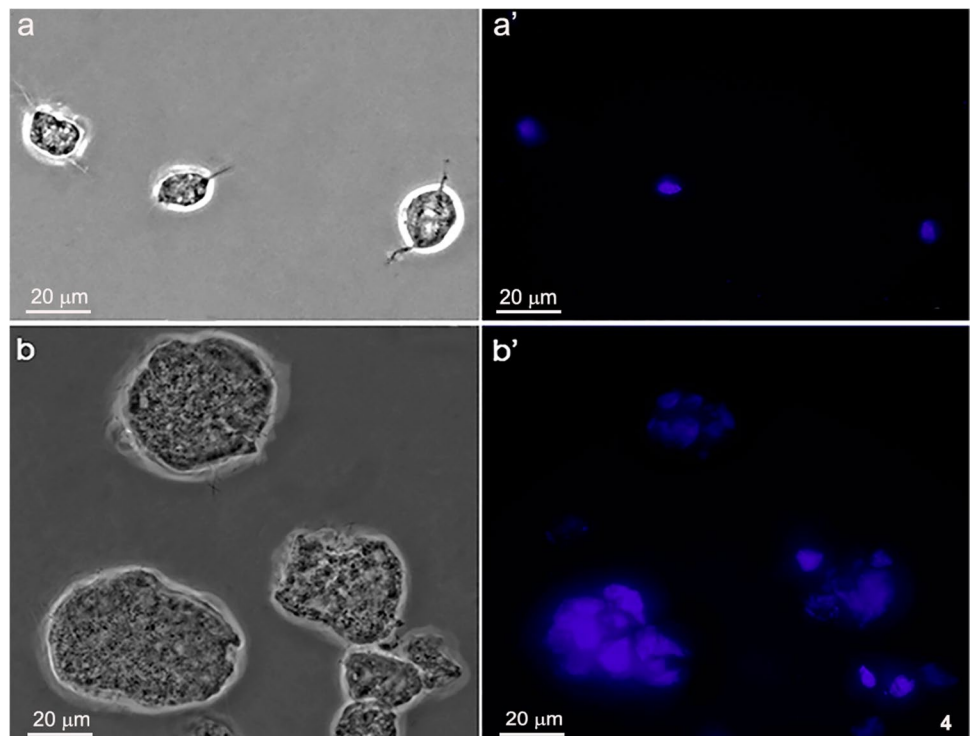


on fluorescence microscopes (Axiphot II, and Elyra PS.1 Zeiss, Germany). The images were acquired using a C5985-10 real-time CCD camera (Hamamatsu, Japan) and Elyra PS.1 (100 $\times$ objective and 405 nm laser). At least 200 cells were analyzed.

Immunofluorescence microscopy

Control and treated parasites were washed in warm PBS (pH 7.2) and adhered to glass coverslips with poly-L-lysine for 10 min at 37 °C. Cells were fixed for 1 h with

Fig. 4 Fluorescence microscopy of *T. vaginalis* control (**a**) and after 24-h treatment with 10 μ M amiodarone (**b**). **a** Control (C) with pear-shaped morphology. **b** Large and multinucleated cells



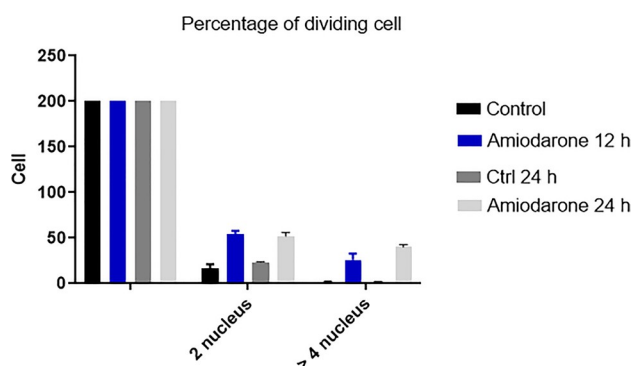


Fig. 5 Determination of the percentage of polynucleated parasites treated with 10 μ M amiodarone for 12 h (a) and 24 h (b). A high number of multinucleated cells are observed. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.05$

4% formaldehyde, permeabilized with 3% Nonidet (NP-40), and incubated with 50 mM NH_4Cl and 3% of bovine serum albumin in PBS (PBS/ BSA) as blocking solutions; after each step mentioned above, the samples were washed with PBS (pH 8.0). Next, cells were labeled with polyclonal anti-acetyl-alpha tubulin antibody, washed with PBS (pH 8.0), and incubated for 1 h with an Alexa Fluor

647-conjugated anti-mouse IgG antibody (LifeTechnologies) diluted 1:100 in PBS/BSA and incubated for 30 min with Hoechst (Molecular Probes, USA). Finally, the slides were washed, mounted with Prolong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, USA), and observed on a fluorescence microscope (Axiphot II, and Elyra PS.1 Zeiss, Germany).

TUNEL assay

The TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP Nick-end labeling) method was performed using the “In Situ Cell Death Detection Kit” test (Roche Diagnostics, Meylan, France). The parasites were incubated with compounds for 12 h and 24 h, fixed at room temperature in 2% formaldehyde (v/v) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) and subsequently washed in PBS. Afterward, the cells were permeabilized with 3% Nonidet-40 (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 40 min. Next, samples were soaked in 50 mM ammonium chloride and 3% bovine albumin (BSA) in PBS for 30 min. The labeling was performed according to the manufacturer’s instructions. Positive controls were treated with DNase I (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 10 min at room temperature. Negative controls were labeled with the

Fig. 6 Cell cycle of *T. vaginalis* treated with 10 μ M amiodarone for 24 h. Treated cells (b) present a reduction G1 phase compared to control cells (a)

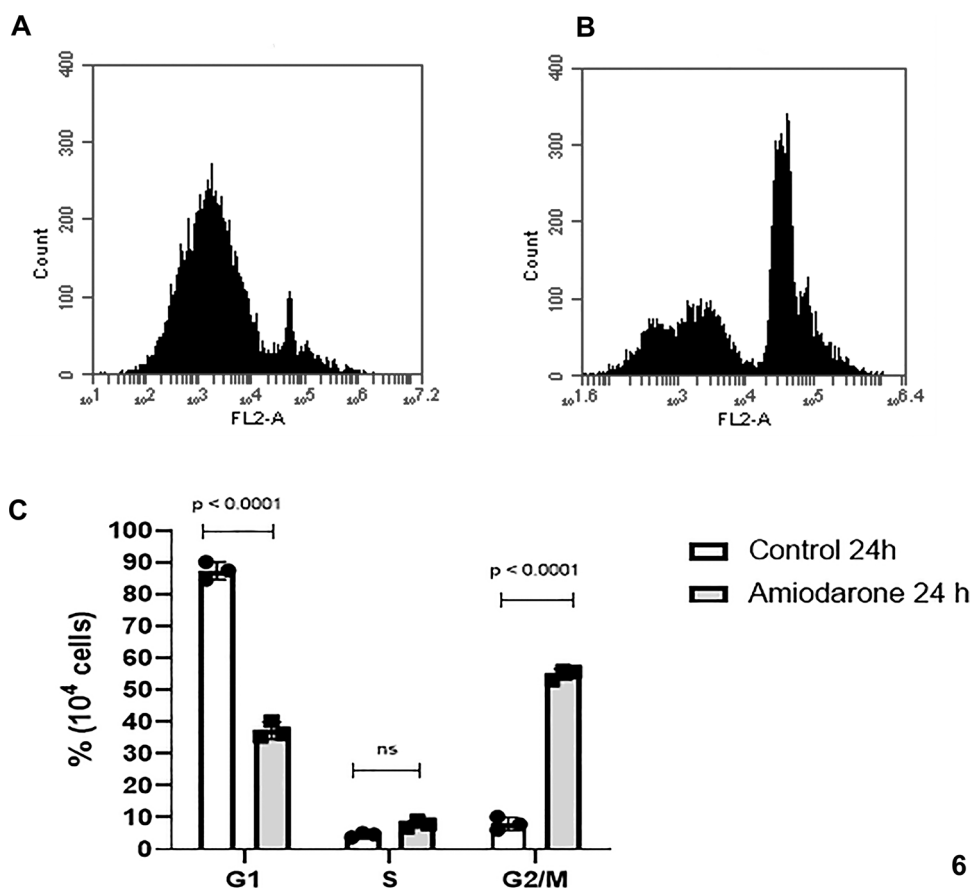
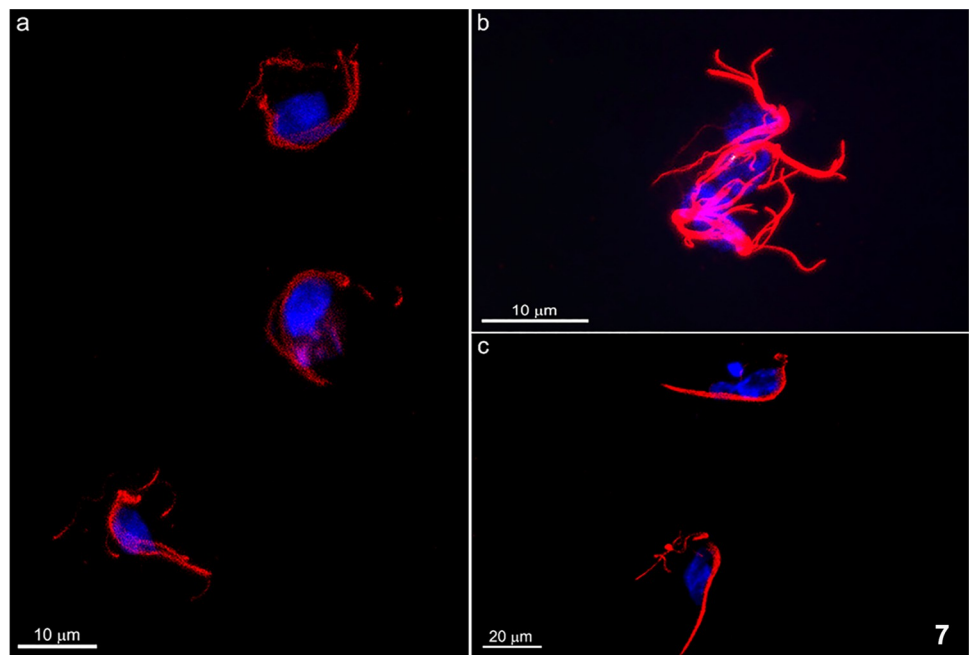


Fig. 7 *T. vaginalis* control (a) and treated with 10 μ M amiodarone for 24 h were observed by confocal fluorescence microscopy. The treated parasites are in mitosis, presenting duplicated cell structures (b) and multiple nuclei (c)



fluorochrome (kit container 2), which lacks the terminal transferase enzyme. The samples were observed on a fluorescence microscope (Axiopt II — Zeiss, Germany). Images were acquired using a C5985-10 real-time CCD camera (Hamamatsu, Japan).

Cell cycle analysis by flow cytometry

Parasites were fixed in 0.25% formaldehyde in PBS for 5 min, washed and resuspended in 70% cold ethanol for 30 min. Afterward, the cells were washed and resuspended in 600 μ l of PBS with 25 μ g/ml of PI (propidium iodide) and 100 μ g/ml of RNase A and incubated for 30 min at room temperature. The analysis was performed in a BD Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson Bioscience BDB, San Jose, CA, USA) filter FL2 585/40 nm, and the data were analyzed using the BD Accuri C6 software.

Scanning electron microscopy (SEM)

Cells adhered to poly-L-lysine-coated (mol wt 300,000) glass coverslips were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2 for 1 h. Next, the cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and postfixed for 1 h in 1% OsO₄, dehydrated in ethanol and critical point dried with liquid CO₂. Finally, cells were coated with a 10-nm-thick layer of sputtered gold–palladium and observed using a Quanta X50 scanning electron microscope (FEI Company, The Netherlands).

Transmission electron microscopy (TEM)

Cells were fixed for 24 h with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. After fixation, the cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and postfixed for 1 h in 1% OsO₄ containing 0.8% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2), washed in PBS, dehydrated in acetone, and embedded in Epon. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed using Hitachi HT 7800 transmission electron microscope.

Cytochemical localization of glycogen

The parasites were fixed and processed as described above for TEM. Subsequently, 90-nm sections were collected on gold grids and incubated for 20 min in a solution containing 1% periodic acid, washed, and incubated with 1% thiosemicarbazide in 10% acetic acid for 24 h. Successive washes were carried out in 10%, 5%, and 2% acetic acid for 10 min each. Afterward, they were incubated with 1% silver proteinase for 30 min, protected from light. Subsequently, successive washes in distilled water were performed for 10 min each, and the unstained sections were observed on a Hitachi HT 7800 transmission electron microscope.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 9 software using Student's *t*-test to determine the

percentage of polynucleated parasites and determine cell cycle phases of treated cells. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

Results

Effect of the compounds on the parasite growth

Figure 2a–c shows the effect of amiodarone, dronedarone, and amioder on parasite growth. We did not observe cell growth inhibition when amiodarone was used (Fig. 2a), even with a concentration of 10 μ M. In contrast, there was an increase in the number of cells. MTZ, 2.5 μ M for 48 h, was used as a positive control and showed an inhibitory effect with an IC₅₀. In the case of amioder (Fig. 2b), we observed a dose-dependent inhibitory effect with an IC₅₀ of 3.5 μ M. At 10 μ M, the inhibition was almost the same observed for 2 μ M MTZ. When dronedarone was used (Fig. 2c), a high inhibitory effect was also observed with an IC₅₀ of 11 μ M. It is important to point out that DMSO did not affect parasite growth at the concentration used to dilute the compounds.

Light microscopy observation

We noted that incubation of *T. vaginalis* with amiodarone increased the number of cells, as shown in Fig. 3. Untreated cultures showed free cells (Fig. 3a), whereas amiodarone-treated cultures (Fig. 3b–d) exhibited cell aggregates of various sizes after 24 h. Fluorescence microscopy analysis of the cells labeled with DAPI to identify the nuclei showed a significant increase in the number of free cells displaying two or more than four nuclei in free cells (Fig. 4a and b). Figure 5 shows the percentage of cells containing two or four nuclei. The percentage is significantly higher in cells incubated for 12 or 24 h in the presence of amiodarone. Figure 6 shows an analysis of the parasite's cell cycle in control and amiodarone-treated cells using flow cytometry. While most control cells are in the G1 phase, a marked increase of cells at the G2 phase is observed in treated cells. (Fig. 6a–c). Immunolocalization of acetylated tubulin of cells treated with amiodarone showed duplicated cytoskeletal structures (Fig. 7a and b) and cells with two nuclei (Fig. 7c).

The TUNEL assay (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP Nick-end labeling) was used, with adequate controls, to verify if amioder and donedarone, which inhibited cell growth, killed the cells by an apoptosis-like mechanism. Positive controls were treated with labeled DNase I for 10 min at room temperature, while negative controls were labeled with the kit fluorochrome, which lacks the enzyme transferase terminus. Figure 8a shows control cells, where no staining was observed. Figure 8b shows a positive control using DNase-treated cells where staining was observed. In

addition, *T. vaginalis* treated with 10 μ M amioder (Fig. 8c) or dronedarone (Fig. 8d) for 24 h was also labeled, thus indicating induction of death by an apoptosis-like mechanism.

Scanning electron microscopy observation

Figure 9a shows the general shape of untreated free cells as seen by scanning electron microscopy. *T. vaginalis* exhibited a normal pear-shaped morphology, with four anterior flagella and a recurrent flagellum attached to the cell body. Parasites incubated in the presence of amiodarone are in aggregates of various sizes, which may reach up to 80 μ m (Fig. 9b–d). Parasites incubated in the presence of amioder or dronedarone showed rounded and deformed cells (Fig. 10a–d). Small cell aggregates were observed in dronedarone treated cells (Fig. 10e and f).

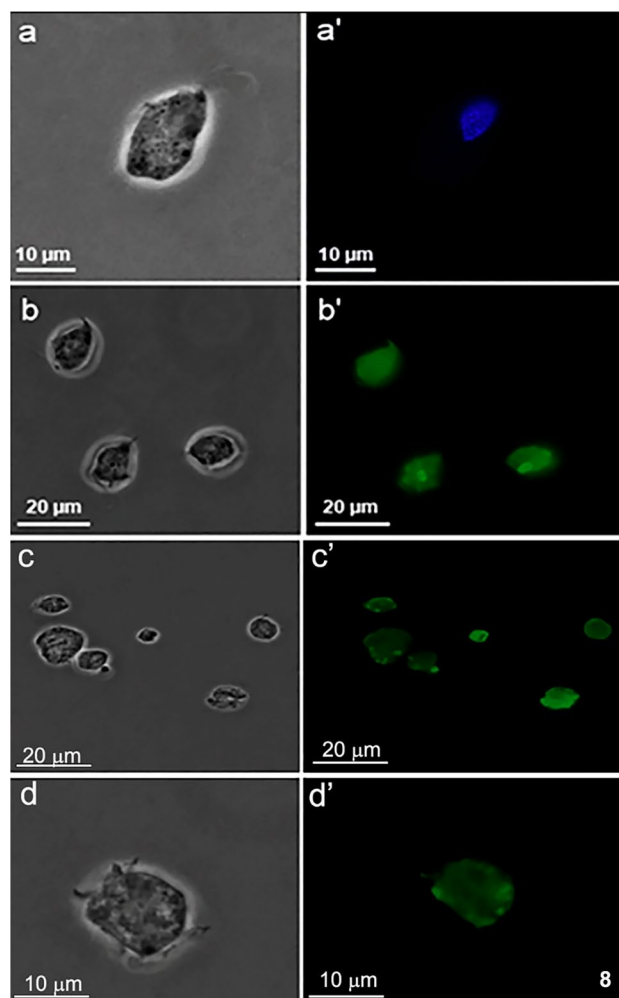


Fig. 8 TUNEL test — tagging for fragmented DNA. **a–a'** control cells. **b–b'** positive control treated with DNase I. Fluorescence microscopy of *T. vaginalis* after treatment with 10 μ M amioder (**c–c'**) and 10 μ M dronedarone (**d–d'**) for 24 h. DNA fragmentation was noted with the TUNEL technique

Transmission electron microscopy (TEM) analysis

Figure 11a shows a TEM image of a control cell where the structures of *T. vaginalis* are observed as the nucleus, Golgi complex, hydrogenosomes, vacuoles, and glycogen particles distributed throughout the cell. Amiodarone-treated cells showed hydrogenosomes located mainly at the cell periphery (Fig. 11b and c), a greater number of glycogen aggregates, and nuclear chromatin distributed as dense structures (Fig. 11) rather than the more diffuse distribution observed in untreated cells (Fig. 11a). After treatment with amiodarone for 24 h, multinucleated (Fig. 12a) and aggregated cells (Fig. 12b) formed a tissue-like organization without cell fusion. The hydrogenosomes showed an elongated shape (Fig. 12c). In addition, cells exhibited large masses of glycogen particles (Fig. 12d), identified by Thiéry's cytochemical method, based on periodic acid oxidation followed by incubation with thiosemicarbazide and silver proteinate (Fig. 13a and b). TEM of dronedarone-treated cells showed hydrogenosomes exhibiting a light matrix compared to untreated cells (Fig. 14).

Discussion

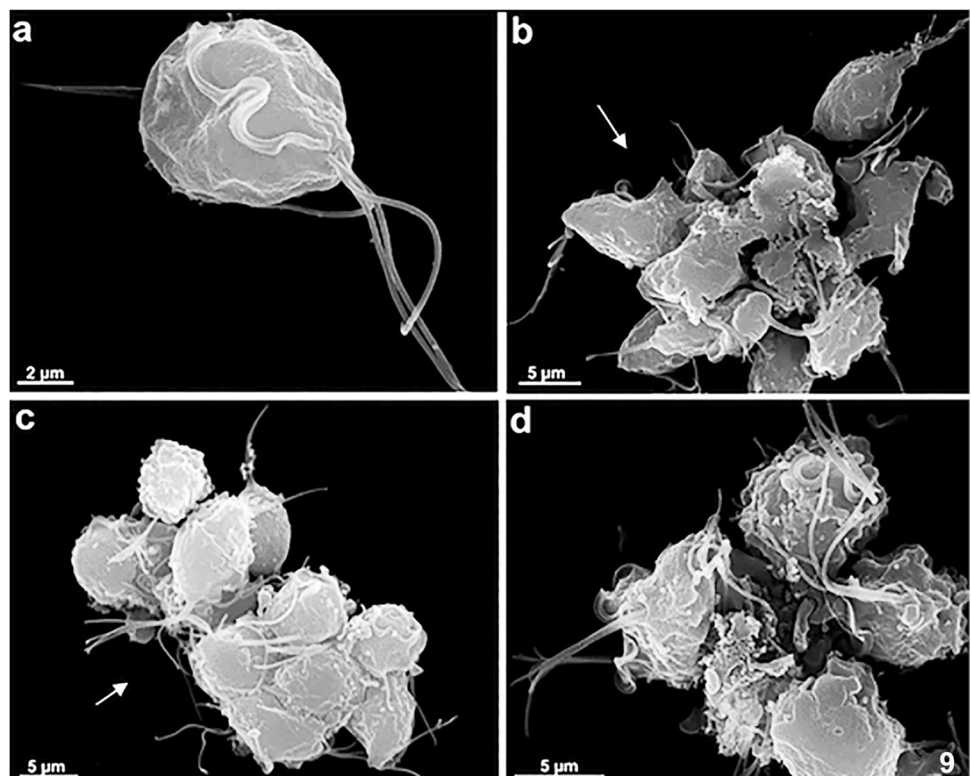
Metronidazole is the main compound of choice in the treatment of trichomoniasis and other parasitic infections caused by anaerobic microorganisms (Löfmark et al. 2010). Although

effective, it presents several problems, as pointed out in the “Introduction.” Therefore, several groups have undertaken studies to identify new active and less toxic compounds and new parasite drug targets. Examples include (a) azasterols that inhibit sterol methyltransferase involved in the sterol biosynthesis pathway (Rosa et al. 2011), (b) hydroxyquinuclidine, which inhibits squalene synthase (Rocha et al. 2014), (c) amiodarone and its derivatives (Amioder and Dronedarone) that in addition all induce a large increase in the intracellular Ca^{2+} concentration (Benaïm et al. 2021).

Studies in other parasitic protozoa, especially in *T. cruzi* and *Leishmania*, indicate that compounds disrupting intracellular Ca^{2+} homeostasis can kill the parasites with low interference with the host cells. Indeed, Ca^{2+} plays a fundamental role in important signaling processes in eukaryotic cells, and the regulation of Ca^{2+} in parasites differs from what happens in mammalian cells (Benaïm et al. 2020). In this context, amiodarone, commonly used as an antiarrhythmic drug presently used in humans, induced trypanocidal effects on *T. cruzi* (Adesse et al. 2011; Benaïm et al. 2006, 2021; Sass et al. 2019; Veiga-Santos et al. 2012) and *Leishmania* (Benaïm et al. 2014; Martinez-Sotillo et al. 2019; Serrano-Martín et al. 2009a, b), mainly due to disruption of calcium homeostasis. Furthermore, other amiodarone-related compounds, such as dronedarone and amioder, were effective (Benaïm et al. 2021).

Our present observations show that amiodarone at the concentrations of 10 μM , which significantly inhibited the

Fig. 9 SEM of *T. vaginalis* control (a) and treated with 10 μM amiodarone for 24 h (b–d). Wrinkled and clustered cells are observed (arrows) (b–d)



growth of *T. cruzi* (Adesse et al. 2011; Benaïm et al. 2006, 2012; Sass et al. 2019; Veiga-Santos et al. 2012), and *Leishmania* (Benaïm et al. 2014; Martínez-Sotillo et al. 2019; Serrano-Martín et al. 2009a, b), did not interfere with the growth of *T. vaginalis*. In contrast, it stimulated parasite growth and adhesion, forming large cell aggregates. Indeed, immunofluorescence microscopy of DAPI-labelled cells showed large multinucleated cells in amiodarone-treated trichomonads. Labeling for tubulin-containing structures also revealed the presence of multiple cytoskeletal structures within the same cell. Flow cell cytometry analysis also revealed many cells at the G2/M phase of the cell cycle. Thus, these observations indicate that amiodarone stimulated cell division but with blockage of cytokinesis, leading to the appearance of multinucleated cells. In addition, the drug also induced intense cell aggregation with the appearance of large masses containing cells close to each other, even resembling a tissue-like structure. Another significant

effect of amiodarone was the increase in dense cytoplasmic structures identified as glycogen particles using the periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate technique classically used to identify such particles (Thiery 1967), thus indicating interference of the drug in the carbohydrate metabolism. Electron microscopy analysis also indicates changes in the structure of the hydrogenosome. These include their peripheral localization and display of an elongated shape compared to the round shape found in untreated cells. It is important to point out that trichomonads do not present mitochondria. Previous studies have shown that amiodarone and its derivatives target the mitochondria, leading to the collapse of the parasite's membrane electrochemical potential, not affecting the host cell, and inducing a rapid release of Ca^{2+} to the cytoplasm (Benaïm et al. 2006). In other parasites, amiodarone also affects the acidocalcisomes, causing their alkalinization, simultaneously with the release of Ca^{2+} (Benaïm et al. 2020). *T. vaginalis* is an amitochondrial

Fig. 10 SEM of *T. vaginalis* control (a) and after treatment with 10 μM amiodarone (b–c) and 10 μM dronedarone (d–f) for 24 h. The parasites exhibit morphological changes with many deformed and rounded cells (b–c). Notice large cell aggregation (d–f)

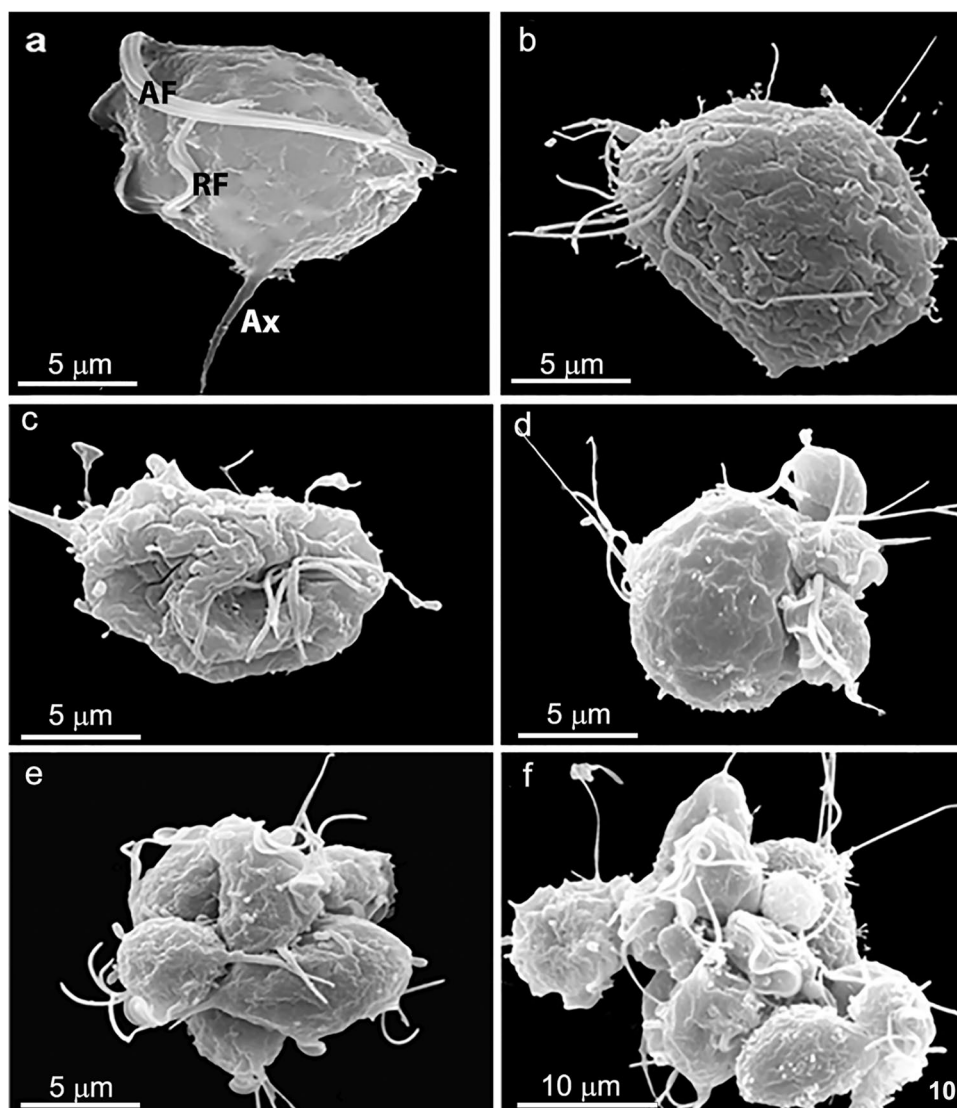
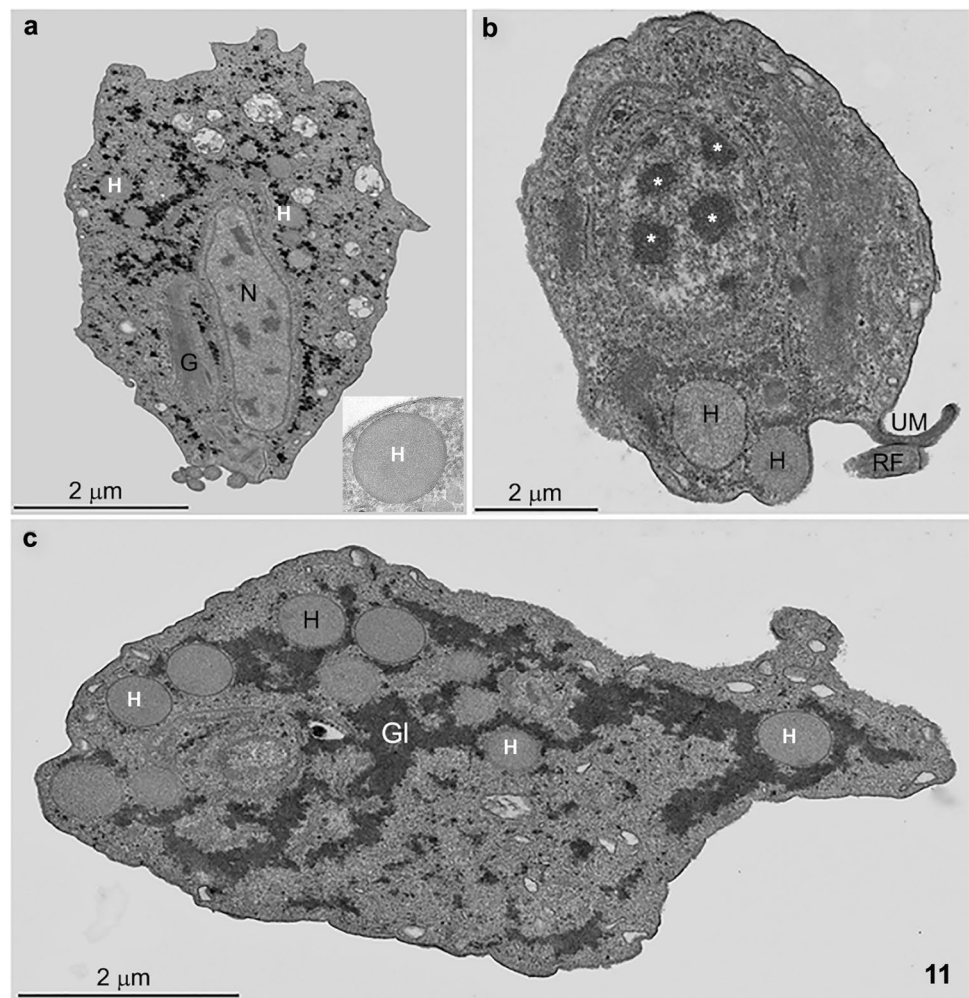


Fig. 11 TEM of *T. vaginalis* control (a) and after treatment with 10 μ M Amiodarone (b–d) 12 h (b–d). Control cells display normal morphology, rounded hydrogenosomes with a full dense matrix (inset), whereas, in treated cells, large masses of condensed chromatin are seen in the nucleus (b) (asterisks); and c cells with a large vacuole (V). d Glycogen granules (Gl, arrowheads) are concentrated around the hydrogenosomes (H). G, Golgi; UM, undulating membrane; RF, recurrent flagellum



cell where the hydrogenosomes are responsible for energy metabolism and accumulate Ca^{2+} , especially at its peripheral vacuole (Benchimol 2008). We did not find any information concerning intracellular Ca^{2+} regulation in *T. vaginalis*. However, neither mitochondria nor acidocalcisomes, characteristic of trypanosomatids and involved in Ca^{2+} homeostasis and the bioenergetics in kinetoplastidae, are present in trichomonads (Docampo and Moreno 2003).

The hydrogenosome has been considered an important target for drugs (Land et al. 2001; Wright et al. 2010; Rosa et al. 2011). Our present observation suggests that in *T. vaginalis*, amiodarone may have multiple effects. Our results show that amioder and dronedarone inhibited parasite growth in dose-dependent with IC_{50} of 3.15 and 11 μ M, respectively (Fig. 2b and c). These values, especially for amioder, are relatively low and point to this chemical group as potential interest in the chemotherapy against trichomoniasis. It is important to point out that the IC_{50} for metronidazole, the drug presently used, is in the range of 2 μ M.

Amioder is a benzofuran derivative based on the structure of amiodarone. Recent studies have shown that this

compound can present an effective effect against epimastigotes and amastigotes multiplying within host cells (Pinto-Martinez et al. 2018). In these cells tested, amioder presents a mechanism of action similar to that of amiodarone, causing, in addition to the increase in $[\text{Ca}^{2+}]$ and the collapse of the electrochemical potential of the mitochondrial membrane, the alkalization of the parasite's acidocalcisomes. A similar effect was found for amioder in *L. donovani* (Martinez-Sotillo et al. 2019).

Dronedarone was synthesized to attenuate the side effects of amiodarone. In vitro experiments against *T. cruzi* showed that dronedarone appears to be more effective than amiodarone (Benaïm et al. 2012; Benaïm and Paniz-Mondolfi 2012). In *T. cruzi*, dronedarone provoked an effect on mitochondria and acidocalcisomes; however, this effect was faster than with amiodarone, and as advantage having a lower IC_{50} (0.75 μ M) when compared to amiodarone (IC_{50} 2.7 μ M) in amastigotes within mammalian host cells (Benaïm et al. 2012; Benaïm and Paniz-Mondolfi 2012).

Both amiodarone and dronedarone were effective against *L. mexicana*, and the causative agent of cutaneous

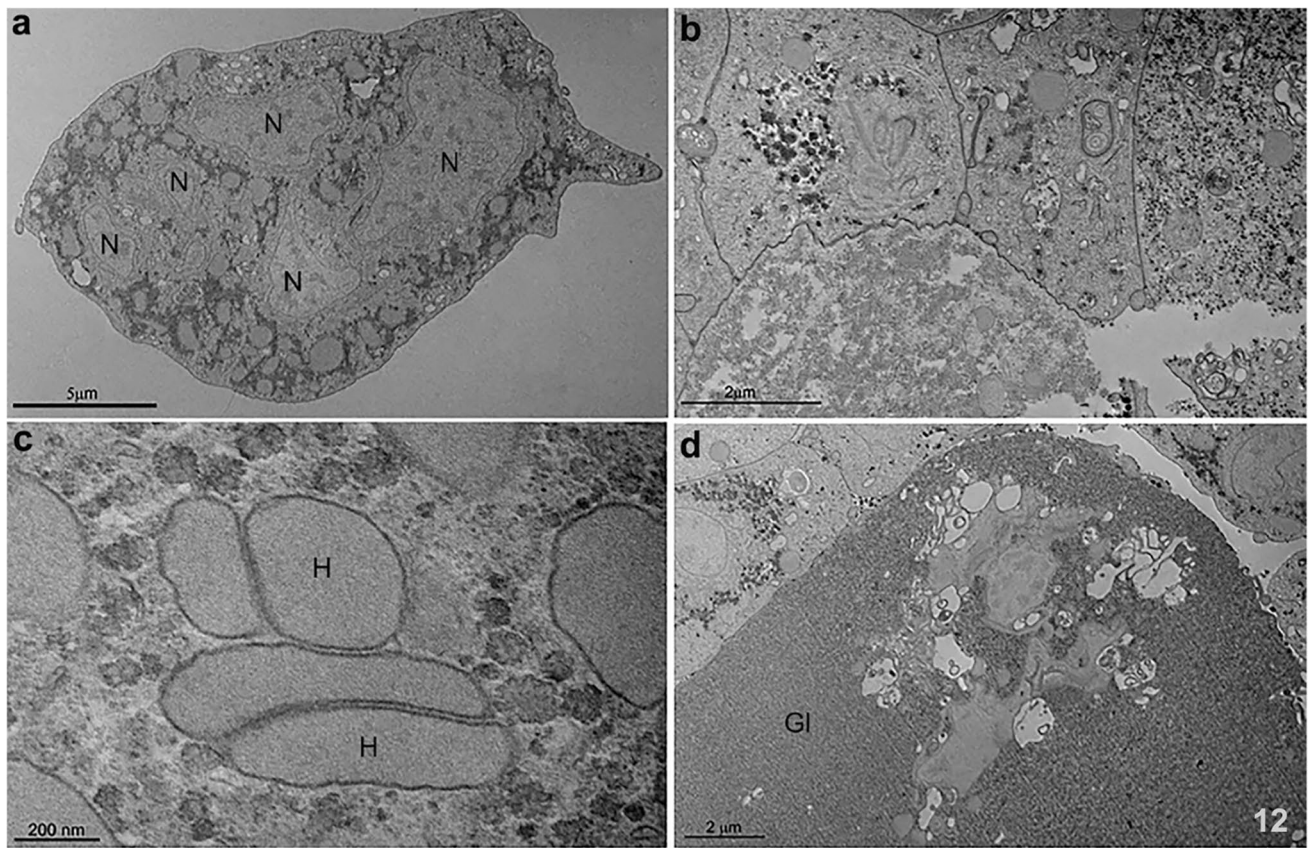


Fig. 12 TEM of *T. vaginalis* treated with 10 μ M amiodarone for 24 h. **a** Multinucleated *T. vaginalis*; **b** clustered cells; **c** elongated hydrogenosomes (H); **d** glycogen (Gl). N, nucleus

leishmaniasis, demonstrating a very low IC_{50} in amastigotes within macrophages Serrano-Martín et al. 2009a, b),

especially in the case of dronedarone where an IC_{50} of 0.65 nM was reported (Benaim et al. 2014).

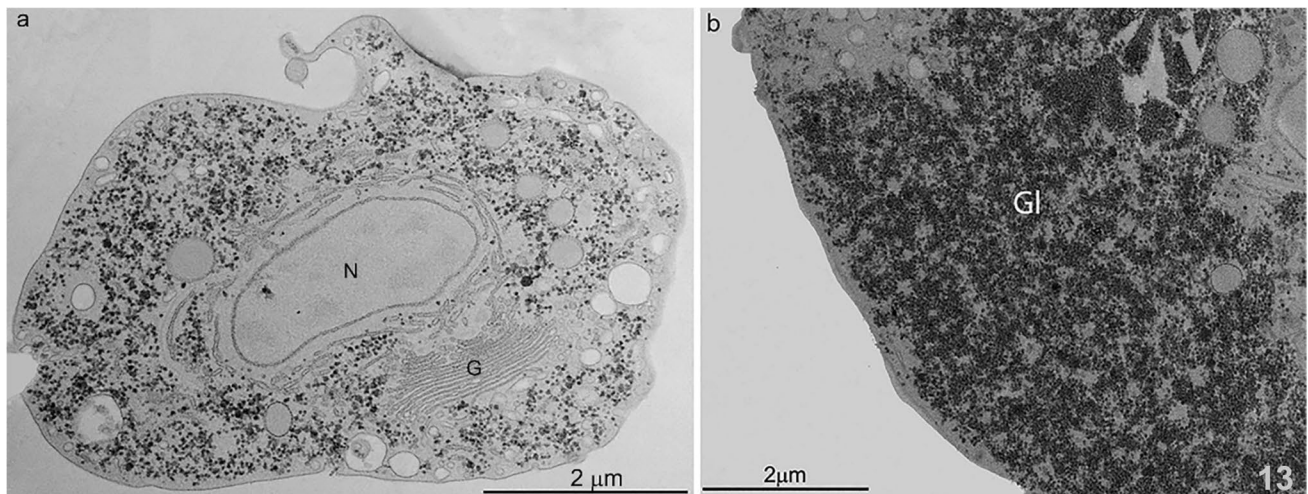


Fig. 13 TEM after Thiéry technique for carbohydrate detection in *T. vaginalis* treated with 10 μ M amiodarone for 24 h. A positive reaction is observed in glycogen (Gl), Golgi (G,) and cell membranes

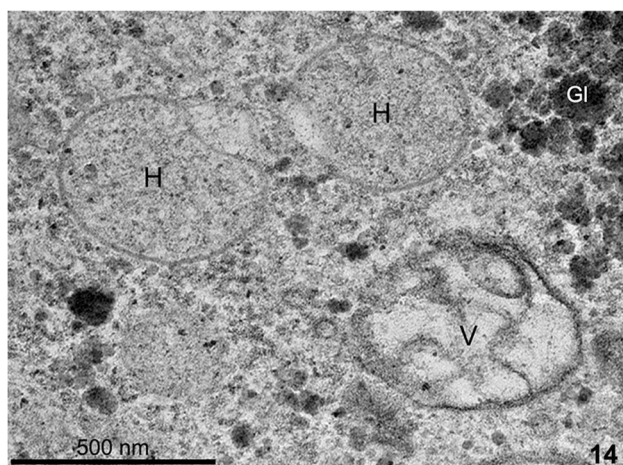


Fig. 14 *T. vaginalis* MET after treatment with the 10 μ M dronedarone compound for 24 h. Hydrogenosomes (H) present an altered morphology with their matrix emptied

In the present study, besides the antiproliferative effects of amioder and dronedarone, these compounds also caused morphological changes in *T. vaginalis*, such as deformed and aggregated cells and alterations in the hydrogenosomes. Furthermore, analyses performed by fluorescence microscopy showed positive staining for the TUNEL assay, indicating cell death by apoptosis when cells were treated with amioder and dronedarone.

Together, these observations indicate that the compounds used in this work should be considered promising for developing new drugs, aiming at alternative chemotherapy strategies for diseases caused by anaerobic protozoa, such as *T. vaginalis*.

Acknowledgements We would like to thank Dr. Elżbieta Hejchman, from the Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, Warsaw, for kindly providing Amioder. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Declarations

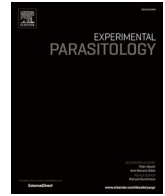
Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Adesse D, Azzam EM, Meirelles Mde N, Urbina JA, Garzoni LR (2011) Amiodarone inhibits *Trypanosoma cruzi* infection and promotes cardiac cell recovery with gap junction and cytoskeleton reassembly in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 55:203–210. <https://doi.org/10.1128/AAC.01129-10>
- Benaïm G, Casanova P, Hernandez-Rodriguez V et al (2014) Dronedarone, an amiodarone analog with improved anti-*Leishmania mexicana* efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2295–2303. <https://doi.org/10.1128/AAC.01240-13>
- Benaïm G, Hernandez-Rodriguez V, Mujica-Gonzalez S, Plaza-Rojas L, Silva ML, Parra-Gimenez N, Garcia-Marchan Y, Paniz-Mondolfi A, Uzcanga G (2012) In vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. *Antimicrob Agents Chemother* 56:3720–3725. <https://doi.org/10.1128/AAC.00207-12>
- Benaïm G, Paniz-Mondolfi AE (2012) The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. *Nat Rev Cardiol* 9:605–609. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.108>
- Benaïm G, Paniz-Mondolfi AE, Sordillo EM, Martinez-Sotillo N (2020) Disruption of intracellular calcium homeostasis as a therapeutic target against *Trypanosoma cruzi*. *Front Cell Infect Microbiol* 10:46. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00046>
- Benaïm G, Paniz-Mondolfi AES, EM. (2021) Rationale for use of amiodarone and its derivatives for treatment of Chagas' disease and leishmaniasis. *Curr Pharmac Design* 27:1825–1833
- Benaïm G, Sanders JM, Garcia-Marchán Y et al (2006) Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with Posaconazole. *J Med Chem* 49:892–899. <https://doi.org/10.1021/jm050691f>
- Benchimol M (2008) The hydrogenosome peripheral vesicle: similarities with the endoplasmic reticulum. *Tissue Cell* 40:61–74. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2007.09.006>
- Diamond LS (1957) The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol* 43:488–490
- Docampo R, Moreno SN (2003) Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol* 6:359–364. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(03\)00099](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00099)
- Edwards DI (1993) Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. Mechanisms of Action. *J Antimicrob Chemother* 31:9–20. <https://doi.org/10.1093/jac/31.1.9>
- Hejchman E, Ostrowska K, Maciejewska D, Kossakowski J, Courchesne JE (2012) Synthesis and antifungal activity of derivatives of 2- and 3-benzofurancarboxylic acids. *J Pharmacol Exp Ther* 343:380–388. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.196980>
- Land KM, Clemens DL, Johnson PJ (2001) Loss of multiple hydrogenosomal proteins associated with organelle metabolism and high-level drug resistance in *Trichomonads*. *Exp Parasitol* 97:102–110. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4587>
- Lewis DA (2010) Trichomoniasis. *Medicine* 38:291–293. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2010.03.007>
- Löfmark S, Edlund C, Nord CE (2010) Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin Infect Dis* 50:S16–S23. <https://doi.org/10.1086/647939>
- Lossick JG (1990) Treatment of sexually transmitted vaginosis/vaginitis. *Clin Infect Dis* 6:S665–81. https://doi.org/10.1093/clinids/12.Supplement_6.S665
- Martinez-Sotillo N, Pinto-Martínez A, Hejchman E, Benaïm G (2019) Antiproliferative effect of a benzofuran derivative based on the structure of amiodarone on *Leishmania donovani* affecting mitochondria, acidocalcisomes and intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Parasitol Int* 70:112–117. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.02.006>
- Mielczarek E, Blaszkowska J (2016) *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. *Infection* 44:447–458. <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0860-0>
- Noël JC, Fayt I, Romero Munoz MR, Simon P, Engohan-Aloghe C (2010) High prevalence of high-risk human papillomavirus infection among women with *Trichomonas vaginalis* infection on monolayer cytology. *Arch Gynecol Obstet* 282:503–505. <https://doi.org/10.1007/s00404-009-1291-x>
- Oates JA, Wood AJJ, Mason JW (1987) Amiodarone. *N Engl J Med* 316:455–466. <https://doi.org/10.1056/NEJM198702193160807>

- Paulish-Miller TE, Augostini P, Schuyler JA, Smith WL, Mordechai E, Adelson ME, Gyax SE, Secor WE, Hilbert DW (2014) *Trichomonas vaginalis* metronidazole resistance is associated with single nucleotide polymorphisms in the nitroreductase genes ntr4Tv and ntr6Tv. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2938–2943. <https://doi.org/10.1128/AAC.02370-13>
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G (1998) Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 11:300–317. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.300>
- Pinto-Martinez A, Hernández-Rodríguez V, Rodríguez-Durán J, Hejchman E, Benaim G (2018) Anti-*Trypanosoma cruzi* action of a new benzofuran derivative based on amiodarone structure. *Exp Parasitol* 189:8–15. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.04.0107>
- Rein MF (1990) Clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in women. Springer, New York, pp 225–234. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3224-7_11
- Rocha DA, de Andrade RI, Urbina JA, de Souza W, Benchimol M (2014) The effect of 3-(biphenyl-4-yl)-3-hydroxyquinuclidine (BPQ-OH) and metronidazole on *Trichomonas vaginalis*: a comparative study. *Parasitol Res* 113:2185–2197. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3871-3>
- Rosa Ide A, Rocha DA, de Souza W, Urbina JA, Benchimol M (2011) Ultrastructural alterations induced by $\Delta(24(25))$ -sterol methyltransferase inhibitors on *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiol Lett* 315:72–78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02178.x>
- Sass G, Madigan RT, Joubert LM, Bozzi A, Sayed N, Wu JC, Stevens DA (2019) A combination of itraconazole and amiodarone is highly effective against *Trypanosoma cruzi* infection of human stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Trop Med Hyg* 101:383–391. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0023>
- Serrano-Martín X, García-Marchan Y, Fernandez A, Rodriguez N, Rojas H, Visbal G, Benaim G (2009a) Amiodarone destabilizes intracellular Ca^{2+} homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1403–1410. <https://doi.org/10.1128/AAC.01215-08>
- Serrano-Martín X, Payares G, De Lucca M, Martinez JC, Mendoza-León A, Benaim G (2009b) Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5108–5113. <https://doi.org/10.1128/AAC.00505-09>
- Sutcliffe S (2006) Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 15:939–945. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0781>
- Thiery JP (1967) Mise en evidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie electronique. *J Microsc* 6:987–1018
- Van Der Pol B, Kwok C, Pierre-Louis B, Rinaldi A, Salata RA, Chen PL, van de Wijgert J, Mmiro F, Mugerwa R, Chipato T, Morrison CS (2008) *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in african women. *J Infect Dis* 197:548–554. <https://doi.org/10.1086/526496>
- Veiga-Santos P, Barrias ES, Santos JF, de Barros Moreira TL, de Carvalho TM, Urbina JA, de Souza W (2012) Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents* 40:61–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.03.009>
- World Health Organization (2012) Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections – 2008. WHO Press, Geneva
- Wright JM, Webb RI, O'Donoghue P, Upcroft P, Upcroft JA (2010) Hydrogenosomes of laboratory-induced metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* lines are downsized while those from clinically metronidazole-resistant isolates are not. *J Eukaryot Microbiol* 57:171–176. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2009.00455.x>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Effects of SQ109 on *Trichomonas vaginalis*

Tatiana Guinancio de Souza ^{a,b,c}, Renato Granado ^{b,c}, Gustavo Benaim ^{d,e},
Wanderley de Souza ^{b,c,f}, Marlene Benchimol ^{a,b,c,f,*}

^a Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, Brazil

^b Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco G, Rio de Janeiro, Brazil

^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia and Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^d Instituto de Estudios Avanzados, Caracas, Venezuela

^e Instituto de Biologia Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

^f CMABio da Escola Superior de Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

SQ109

Chemotherapy

Trichomoniasis

Hydrogenosome

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is a protozoan that causes human trichomoniasis, a sexually transmitted infection (STI) that affects approximately 278 million people worldwide. The current treatment for human trichomoniasis is based on 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole, known as Metronidazole (MTZ). Although effective in eliminating parasitic infection, MTZ is related to serious adverse effects and is not recommended during pregnancy. In addition, some strains are resistant to 5'-nitroimidazoles, prompting the development of alternative drugs for trichomoniasis. Here we show that SQ109 [N-adamantan-2-yl-N'-((E)-3,7-dimethyl-octa-2,6-dienyl)-ethane-1,2-diamine], a drug under development (antitubercular drug candidate that completed Phase IIb/III) for the treatment of tuberculosis, and previously tested in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. SQ109 inhibited *T. vaginalis* growth with an IC50 of 3.15 μ M. We used scanning and transmission electron microscopy to visualize the ultrastructural alterations induced by SQ109. The microscopy analysis showed morphological changes on the protozoan surface, where the cells became rounded with increasing surface projections. In addition, the hydrogenosomes increased their size and area occupied in the cell. Furthermore, the volume and a significant association of glycogen particles with the organelle were seen to be altered. A bioinformatics search was done about the compound to find its possible targets and mechanisms of action. Our observations identify SQ109 as a promising compound against *T. vaginalis* in vitro, suggesting its potential utility as an alternative chemotherapy for trichomoniasis.

1. Introduction

Trichomonas vaginalis is a parasite that causes human trichomoniasis, the most prevalent non-viral sexually transmitted infection (STI) on the planet, affecting approximately 278 million people worldwide (Kreisel et al., 2021). Pregnant women with trichomoniasis may experience miscarriage, premature delivery, premature rupture of the placenta, and pregnancy disorders (Petrin et al., 1998). The disease can also cause infertility (Lewis, 2010; Mielczarek and Blaszkowska, 2016). In men, the disease is usually asymptomatic. However, in more severe cases, inflammation of the urethra and prostate may be present (Rein, 1990). *T. vaginalis* infection is also related to a predisposition to infections caused by the human immunodeficiency virus (HIV) (Van Der Pol et al.,

2008), human papillomavirus (HPV) (No el et al., 2010), and cervical cancer of the uterus and prostate (Sutcliffe et al., 2006).

The current treatment for human trichomoniasis consists of 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole, the Metronidazole (MTZ). It is a compound widely used to treat infections caused by bacteria (*Helicobacter*, *Bacteroides*, and *Clostridium*) and anaerobic parasites such as *Trichomonas*, *Entamoeba*, and *Giardia* (Edwards, 1993). Although effective in eradicating most parasitic infections, this drug is related to serious adverse effects such as nausea, vomiting, dizziness, metallic taste, and insomnia (De Andrade Rosa et al., 2011). Furthermore, it can cause pancreatitis, leukopenia, and neuropathies in the most severe cases. Furthermore, this therapy cannot be used during pregnancy (Lossick, 1990). In addition to treatment toxicity, some strains have

* Corresponding author. Ilha do Funda o-CCS-Laboratório de Ultraestrutura Celular, Instituto de Biof sica Carlos Chagas Filho-Bloco G, CEP: 21941-902, Brazil.
E-mail address: marlenebenchimol@gmail.com (M. Benchimol).

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108549>

Received 9 February 2023; Received in revised form 23 April 2023; Accepted 14 May 2023

Available online 16 May 2023

0014-4894/  2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

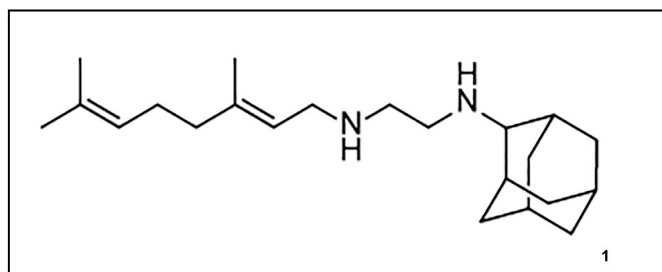


Fig. 1. Molecular chemical structure of SQ109.

become resistant to 5'-nitroimidazoles (Paulish-Miller et al., 2014).

Several compounds have been tested against protozoa parasites; among them, Miltefosine, Methyl jasmonate, $\Delta(24(25))$ -sterol methyl-transferase inhibitors, 3-(biphenyl-4-yl)-3-hydroxyquinuclidine (BPQ-OH), Lactacystin, Zinc-clotrimazole complexes, Amiodarone, Amioder, Dronedarone, Thiosemicarbazones 49, 51, and 63, selenoisosters 74 and 75, β -Lapachone, BPQ-OH, drugs such as Ixazomib and carmaphycin-17, exhibited effects on the growth curve and affected cell organelles of the parasites (reviewed by Benchimol et al., 2022). In addition to nitroimidazoles, articles describe promising plant-based compounds with anti-trichomonal activity in vitro and in vivo (Hashemi et al., 2021). However, in-depth in vivo evaluation of the compounds and their clinical evaluation has not been performed. Other studies provided an overview of clinically evaluated systemic and topical treatment options for human trichomoniasis. Furthermore, they summarized the current knowledge on herbal, semisynthetic, and synthetic compounds evaluated for efficacy as anti-Trichomonas (Küng et al., 2019). Therefore, developing new alternative drugs for trichomoniasis is necessary and urgent. SQ109[N-adamantan-2-yl-N'-((E)-3,7-dimethyl-octa-2,6-dienyl)-ethane-1,2 diamine] is an antitubercular drug candidate that completed Phase IIb/III clinical (Baek et al., 2022). It has been reported that SQ109 has in vitro activity against the parasite *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease (Veiga-Santos et al., 2015), where this compound inhibited the proliferation of intracellular amastigotes as well as epimastigotes forms. Furthermore, SQ109 provoked major ultrastructural changes in the three life cycle forms of this parasite (Veiga-Santos et al., 2015). SQ109 also inhibited the growth of the amastigote form of *Leishmania mexicana* with a good selectivity index. In addition, it was also active against promastigotes, disturbing Ca^{2+} homeostasis (García-García et al., 2016). SQ109 also effectively inhibited the proliferation of *Leishmania donovani*, the parasite responsible for visceral leishmaniasis, exhibiting a toxic effect on amastigotes. It was demonstrated that SQ109 induced rapid damage in acidocalcisomes (Gil et al., 2020), organelles involved in many important functions, including Ca^{2+} homeostasis. The compound significantly increased intracellular Ca^{2+} concentration, causing the parasite's death (Gil et al., 2020). The present work describes results obtained using SQ109 in *T. vaginalis*.

2. Materials and methods

2.1. Parasite and cell culture

The JT strain of *T. vaginalis* was isolated at the Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio de Janeiro in Brazil. *T. vaginalis* organisms were grown in batch culture in the complex Trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium supplemented with 10% heat-inactivated horse serum (Diamond, 1957). The cells were grown for 24 h at 37 °C, corresponding to the logarithmic growth phase.

2.2. Compound

Fig. 1a shows the chemical structure of SQ109 [N-adamantan-2-yl-N'-((E)-3,7-dimethyl-octa-2,6-dienyl)-ethane-1,2 diamine]. This

compound was gently provided by Prof. Antonios Kolocouris from the Department of Pharmacy, University of Athens, Greece, and Prof. Eric Oldfield from the Department of Chemistry, the University of Illinois at Urbana-Champaign, USA).

2.3. Effect of the compound on parasite growth

Parasites were grown to a density of 1×10^5 cells/ml. After 24 h of parasite growth, the compound SQ109 was added at different concentrations (1, 5, 10, and 20 μM) from stock solutions previously diluted in dimethylsulfoxide (DMSO). The final concentration of DMSO in the growth medium never exceeded 0.1% (v/v). Cell densities were determined using flow cytometry.

2.4. Viability assays

The viability of the cells was assessed using fluorescein diacetate (FDA) (Sigma, USA) and 7-Aminoactinomycin (7-AAD) (Sigma, USA). At different time and drug concentration points, the cells were stained with 10 $\mu\text{g/ml}$ of FDA and 0,25 $\mu\text{g/ml}$ of 7-AAD at 37 °C for 5 min for fluorescence analysis. Viable cells were seen in green color with FDA, whereas dead cells fluoresced with an orange color with 7-AAD. The images were acquired using a fluorescence microscope (Axiphot II – Zeiss, Germany).

2.5. Immunofluorescence microscopy

Control and treated parasites were washed in warm PBS (pH 7.2) and adhered to glass coverslips with Poly-L-lysine for 10 min at 37 °C. Cells were fixed for 1 h with 4% formaldehyde, permeabilized with 3% Nonidet (NP-40), and incubated with 50 mM NH_4Cl and 3% of bovine serum albumin in PBS (PBS/BSA) as blocking solutions; after each step mentioned above, the samples were washed with PBS (pH 8.0). *Trichomonas* was incubated for 30 min with Hoescht (Molecular Probes, USA) diluted at 1:200 (Midlej et al., 2019). Finally, the slides were washed, mounted with Prolong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, USA), and observed in a fluorescence microscope (Axiphot II and Elyra PS.1 Zeiss, Germany).

2.6. Hydrogenosomal membrane potential

Control and treated *T. vaginalis* were incubated in 5 $\mu\text{g/ml}$ JC-1 dye at 37 °C for 15 min. JC-1 can selectively enter into hydrogenosomes and, according to the magnitude of the membrane potential, change its oligomeric state, thereby allowing it to fluoresce. The red: green fluorescence intensity ratio for JC-1 depends on the hydrogenosomal membrane potential (Vilela et al., 2010), where a higher ratio indicates a higher hydrogenosomal membrane potential. CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone), a mitochondrial membrane potential disrupter, was used as a positive control to confirm the JC-1 response. A 1 μL aliquot of a 50 mM CCCP solution was added to the cells at 37 °C for 5 min in a final volume of 1 mL. The images were acquired using a fluorescence microscope (Axiphot II – Zeiss, Germany).

2.7. Scanning electron microscopy (SEM)

Cells adhered to Poly-L-lysine-coated (mol wt 300,000) glass coverslips were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2 for 1 h. Next, the cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and postfixed for 1 h in 1% OsO_4 , dehydrated in ethanol, and critical point dried with liquid CO_2 . Finally, cells were coated with a 10 nm-thick layer of sputtered gold-palladium and observed using a Quanta X50 scanning electron microscope (FEI Company, The Netherlands).

2.8. Transmission electron microscopy (TEM)

Cells were fixed for 24 h with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. After fixation, the cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and postfixed for 1 h in 1% OsO₄ containing 0.8% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2), washed in PBS, dehydrated in acetone, and embedded in Epon. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed using the Hitachi HT 7800 transmission electron microscope.

2.9. Morphometry

For morphometrical analyses, at least 20 randomly selected cell images were obtained with the same magnification, where it was better to distinguish the hydrogenosomes from control and drug-treated cells. The ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>) was used to delineate and measure the surface area and volume of the whole cell and each hydrogenosome observed.

2.10. Cytochemical localization of glycogen

The parasites were fixed and processed as described above for TEM. Subsequently, 90 nm sections were collected on gold grids, incubated for 20 min in a solution containing 1% periodic acid, washed, and incubated with 1% thiosemicarbazide in 10% acetic acid for 24 h. Successive washes were carried out in 10%, 5%, and 2% acetic acid for 10 min each. Afterward, they were incubated with 1% silver proteinate for 30 min, protected from light. Subsequently, successive washes in distilled water were performed for 10 min each, and the unstained sections were observed in a Hitachi HT 7800 transmission electron microscope.

2.11. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 9 software using Student's t-test to determine the morphometry and stereology of hydrogenosomes. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.01$.

2.12. Prediction of molecular interactions

For the molecular interaction investigation and prediction phase, molecular docking studies involving the *T. vaginalis* ferredoxin protein (TvFd), PDB code: 1L5P 2.20 Å (Crossnoe et al., 2002), and compounds MTZ and SQ109 were performed.

2.13. Molecular docking simulation

For the molecular docking step, the PYRX v.0.8 program was used, which brings together a large set of other programs for performing the docking processes (AutoDock 4 and AutoDock Vina), input file generation (AutoDock Tools), programming/scripting language (Python), graphical interface (wxPython) and others such as Open Babel and matplotlib (Dallakyan and Olson, 2015).

Initially, a redocking process was performed, a coupling between the TvFd protein used as a template and its natural ligand, the [2Fe–2S] complex, to identify the energies of the interactions and the grid box coordinates and size based on information from its interactions with [2Fe–2S] complex deposited on PDB Bank (Crossnoe et al., 2002). Next, the docking step was performed between the TvFd crystal and the compounds SQ109 and MTZ (drug of choice for the treatment of trichomoniasis), as well as the [2Fe–2S] complex (natural ligand), being the SMILES format of the compounds converted into.pdb format (required for molecular docking analyses) with the aid of the SMILES online translator and NCI/CADD Group structure file generator (<https://cactus.nci.nih.gov/translate/>).

The protein and compounds (ligands) were optimized by the free

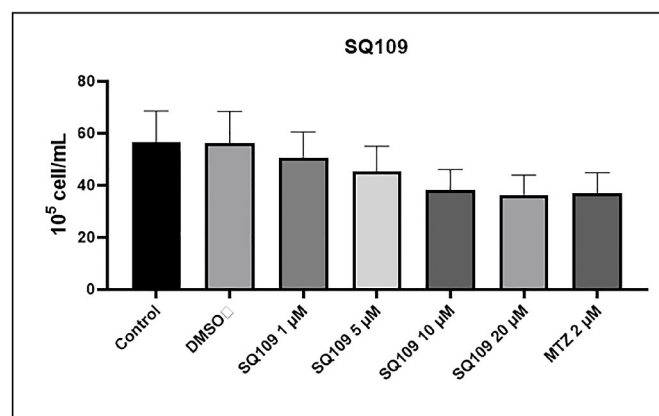


Fig. 2. (a) *Trichomonas vaginalis* control and treated with DMSO, 1, 5, 10, 20 µM SQ109, and 2 µM of metronidazole (MTZ). Arrow indicates the time of addition of the drug (12 h). The number of trophozoites was determined using flow cytometry.

APBS & PDB2PQR server (<https://server.poissonboltzmann.org/>) for correct protonation, simulating a pH 6.5 environment (Crossnoe et al., 2002).

In the PYRX interface, the grid box was built to cover the region of the active site residues that acts with the natural ligand [2Fe–2S] at coordinates $x = 12$, $y = 50$, and $z = 2$; size $20 \times 20 \times 20$. On the other hand, the docking simulation was performed at an exhaustivity equal to 100, generating 10 poses for each compound, including the natural ligand.

The residues of the target active site interacting with the ligands were identified by the BIOVIA Discovery Studio 2021 program (Jurrus et al., 2018). UCSF Chimera (developed by the Resource for Bio-computing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, with NIH support P41-GM103311) and PyMOL (Molecular Graphics System, version 2.0 Schrödinger, LLC) was used to generate the images and files in.pdb extension.

3. Results and discussion

3.1. Effect of the compounds on the parasite growth

Fig. 2 shows the effect of various SQ109 concentrations on the growth of *T. vaginalis*. MTZ, which was used as a positive control, showed a significant inhibitory effect with an IC₅₀ of 2.5 µM after 48 hs. We observed a dose-dependent inhibitory effect of SQ109 with an IC₅₀ of 3.15 µM. At 10 µM, the inhibition was almost the same as at 2 µM MTZ. It is important to note that DMSO did not affect parasite growth at the concentration used to dilute the compounds.

Previous studies showed higher activity against *T. cruzi*, with an IC₅₀ of 0.5 and 4.6 µM observed for amastigotes and epimastigotes, respectively (Veiga-Santos et al., 2015). In the case of intracellular amastigotes of *Leishmania donovani*, an IC₅₀ of 11 nM was found (Gil et al., 2020). Studies on *Mycobacterium tuberculosis* showed inhibitory activity with IC₅₀ with 26 µM (Protopopova et al., 2005). In addition, the cytotoxic tests looking for red cell hemolysis point to EC₅₀ higher than 80 µM (Veiga-Santos et al., 2015) and CC₅₀ of 2.5 µM using LLCMK₂ cells (Veiga-Santos et al., 2015). These values point to significant potential for using SQ109 as a chemotherapeutic agent. In addition, it is important to point out that SQ109 is an antitubercular drug candidate that has completed Clinical Phase IIb/III (Baek et al., 2022).

3.2. Microscopy observations

Light microscopy observations indicate that SQ109 induces *T. vaginalis* aggregation. We used DAPI-labeled fluorescence microscopy

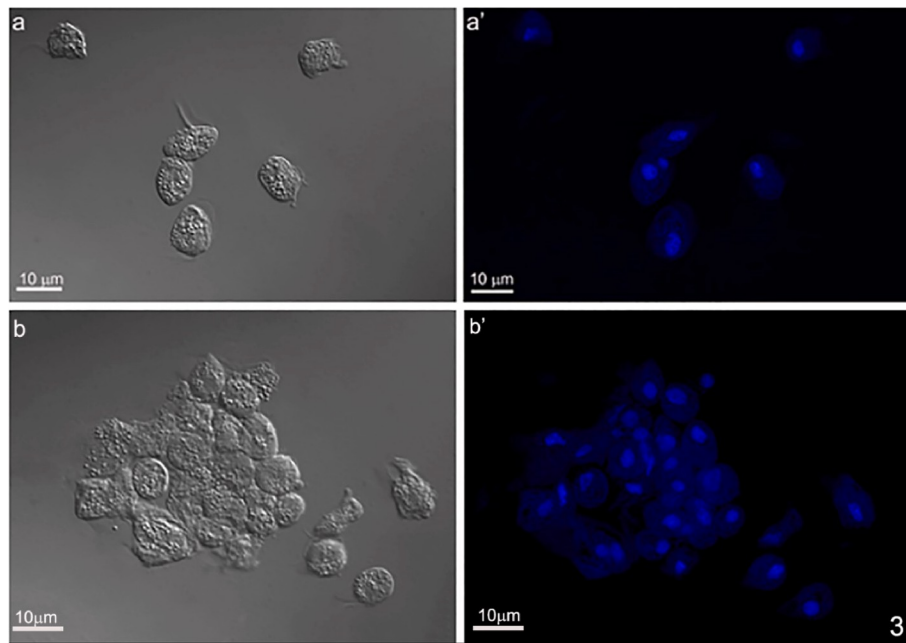


Fig. 3. *Trichomonas vaginalis* was observed in confocal fluorescence microscopy. Control (a-a') was treated with 10 μ M SQ109 for 24 h and labeled with DAPI. Notice clustered cells after drug treatment (b-b').

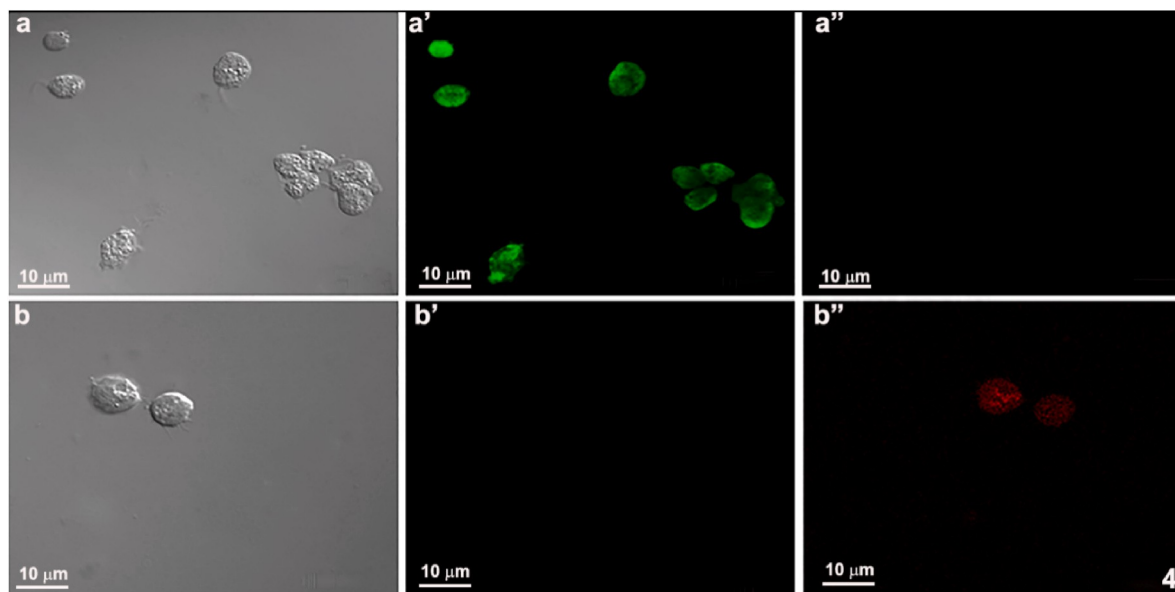


Fig. 4. Comparison between control *T. vaginalis* trophozoites and SQ109-treated cells labeled with 7-AAD and FDA. DIC (a-b). Fluorescence microscopy using 7-AAD $\times$ FDA labeling shows that the control parasites (a) are labeled with FDA (a') but not with PI (a''). In contrast, SQ109-treated parasites (b) are FDA negative (b') and 7-AAD-positive (b'').

analysis to identify the nucleus to show that the aggregated cells display individual nuclei (Fig. 3).

3.3. Cell viability using 7-AAD–FDA labeling

To verify whether SQ109 treatment reduces cell viability, 7-AAD and FDA were simultaneously used. Cells with intact cell membranes, which are assumed viable, retain the FDA dye and fluoresce in green. On the other hand, cells with a nonfunctional or compromised membrane incorporate the 7-AAD dye and are assumed as nonviable. As seen in Fig. 4, the control cells presented only green fluorescence, excluding 7-AAD labeling. In contrast, SQ109-treated *T. vaginalis* displayed 7-AAD

staining.

Scanning electron microscopy showed that SQ109-treated *T. vaginalis* displayed a rounded shape, in contrast to the characteristic pear-shaped control parasites (*T. vaginalis*) (Fig. 5). In addition, drug-treated parasites showed changes on the cell surface with much more protrusions.

Transmission electron microscopy (TEM) analysis revealed a significant increase in the number and size of the hydrogenosomes in SQ109-treated cells (Figs. 6 and 9).

To check this observation, we conducted a morphometrical analysis using a statistically significant sample where at least twenty cells were examined in control and drug-treated cells. As a result, the mean

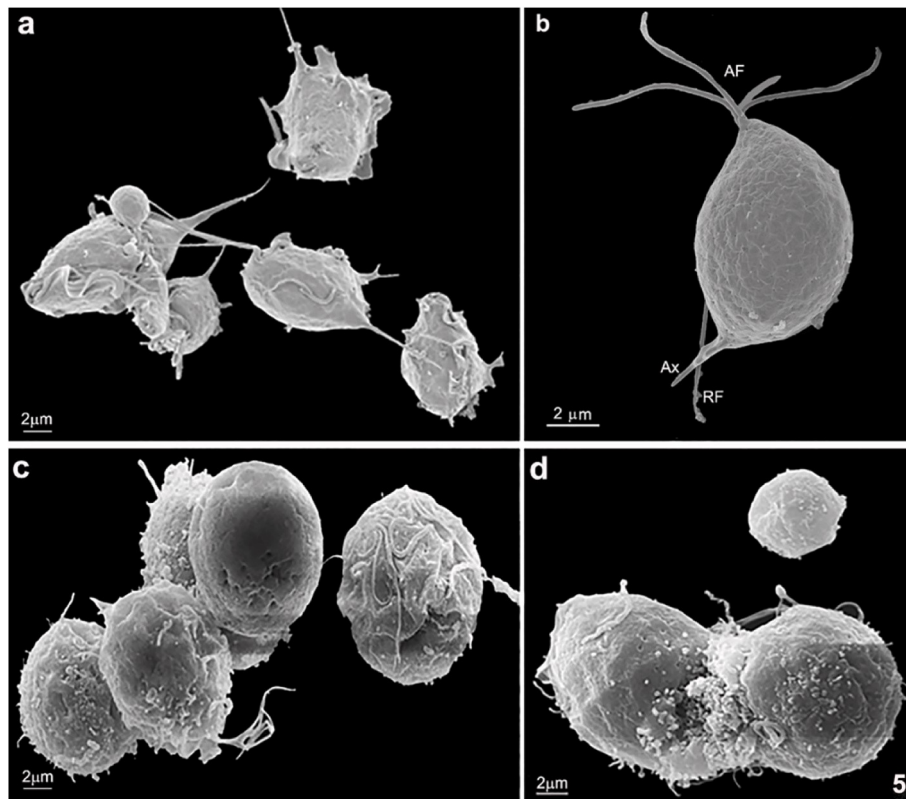


Fig. 5. Scanning electron microscopy of *Trichomonas vaginalis* control (a–b) and treated with 10 μ M SQ109 for 24 h (c–d). Note the rounded cells and morphological changes. AF, anterior flagella; RF, recurrent flagellum; Ax, axostyle.

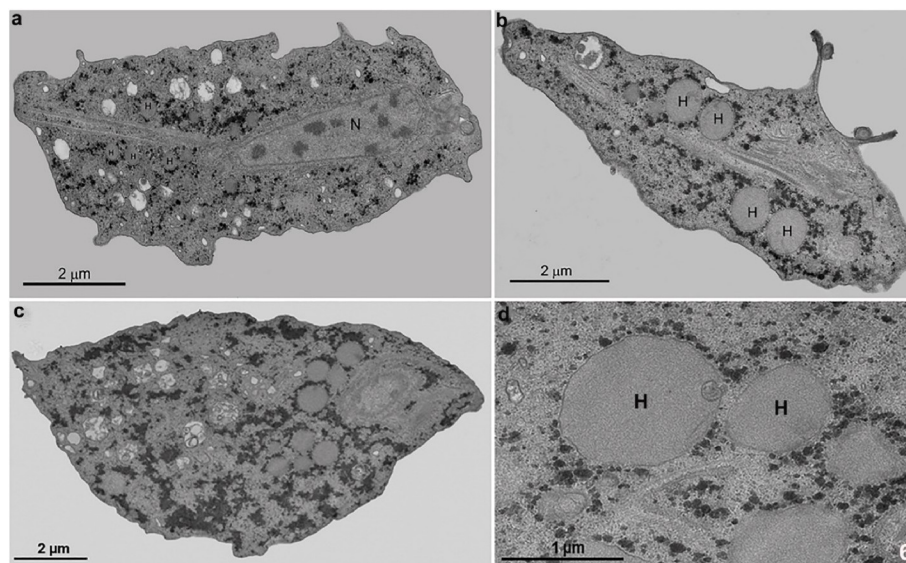
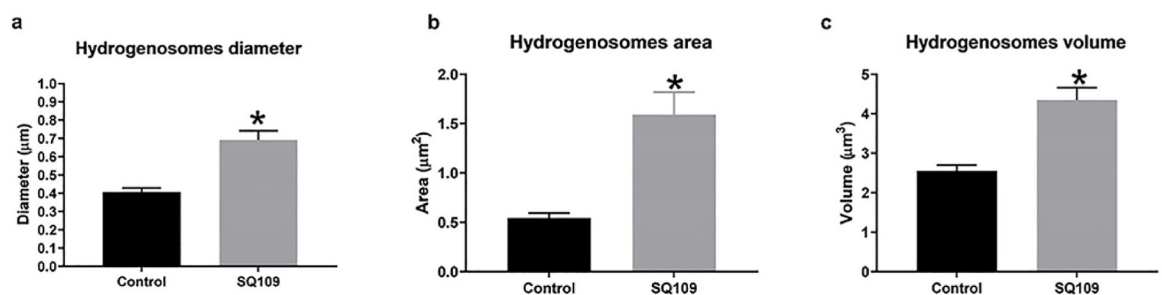


Fig. 6. Transmission electron microscopy of *Trichomonas vaginalis* treated with 10 μ M SQ109 for 24 h. Control (a) and (b–c–d) were treated with 10 μ M SQ109. Note the increase in hydrogenosome numbers, morphological changes, and accumulation of glycogen granules (GL). H, hydrogenosome.

diameter of control and treated cells was 400 nm and 700 nm, respectively, indicating a significant increase in the organelle's size. Furthermore, concerning the area occupied in the cell by the hydrogenosomes, we observed mean values of 0.5 and 1.5 μ m² for control and treated cells, respectively. In addition, concerning the volume occupied by the hydrogenosomes, we obtained mean values of 2.6 μ m³ (control cells) and 4.4 μ m³ (treated cells) (Fig. 7). Together, these observations point towards a significant organelle response to SQ109.

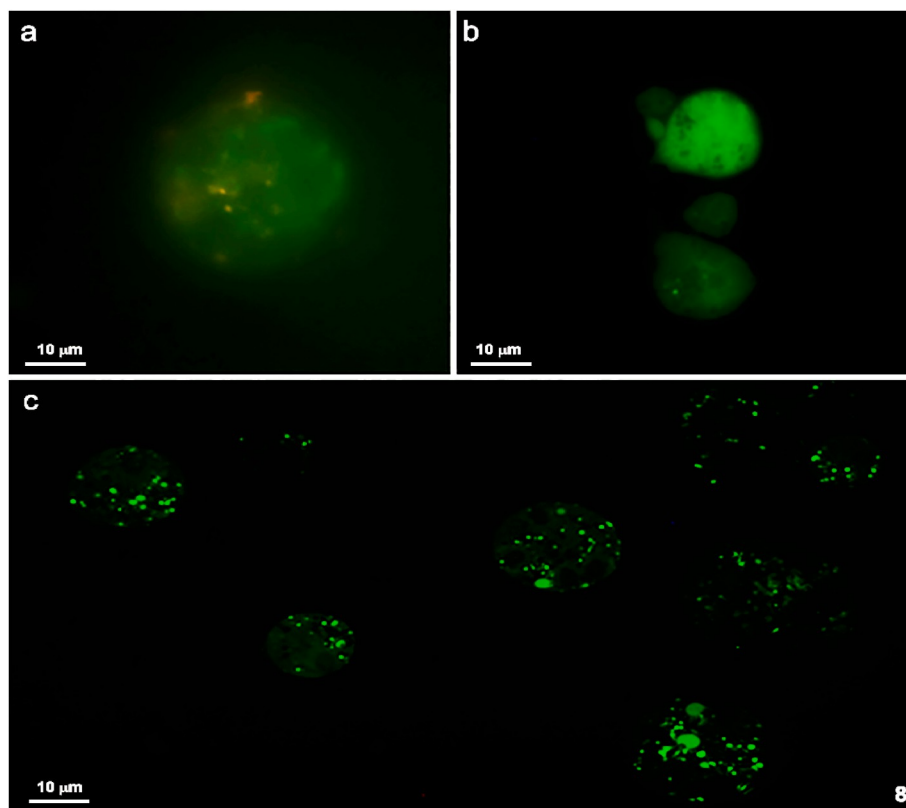
3.4. Hydrogenosome viability using JC-1

A viability test using the fluorescent stain JC-1 was performed on both untreated and SQ109-treated *T. vaginalis* (Fig. 8) to search for possible SQ109-induced changes in the hydrogenosomal membrane potential. JC-1 is a fluorescent lipophilic and cationic probe to determine the mitochondrial membrane potential (Reers et al., 1991). Previous works reported that healthy mitochondria appear in red, while a



7

Fig. 7. Morphometric analysis of hydrogenosomes (a–c). There is a significant increase in the mean diameter of the hydrogenosomes, the mean surface area, and the mean volume they occupy in drug-treated cells.



8

Fig. 8. Parasites treated with JC-1 were observed with fluoresce microscopy. (a) Control. Cells without drug treatment. The hydrogenosomes are lightly stained in red fluorescence. (b) Positive control Treatment with the uncoupler agent CCCP (c) Treatment with SQ109. The hydrogenosomes show green fluorescence indicating a loss of hydrogenosomal membrane potential.

green fluorescence is seen in the mitochondria of dead cells (Reers et al., 1991). As the hydrogenosomes share several similarities with mitochondria, JC-1 showed a similar labeling pattern with hydrogenosomes (Vilela et al., 2010). In the present study, functional hydrogenosomes are labeled in red. In contrast, increased green-labeled hydrogenosomes were observed after treatment with SQ109 (Fig. 8c), indicating a loss of hydrogenosomal membrane potential. CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazine), a mitochondrial membrane potential disrupter, was used as a positive control to confirm the JC-1 response (Fig. 8b).

Further biochemical studies are necessary to get some insight into this effect. Transmission electron microscopy showed that the hydrogenosome surface was covered with small dense particles (Fig. 9). These particles were identified as β -glycogen particles since their density increased when the sections were sequentially incubated in the presence of periodic acid, thiosemicarbazide, and silver proteinate (Benchimol

and Bernardino, 2002).

Although the morphological changes induced by SQ-109 are very clear, they do not indicate its mechanism of action. Studies carried out with *Mycobacteria tuberculosis* provide evidence that it targets membrane protein Large 3 (MmpL3) and dissipates the transmembrane electrochemical proton gradient necessary for cell-wall biosynthesis and bacterial activity (Zhang et al., 2019). Also interferes with lipid transporters and drug extrusion from the bacteria (Zhang et al., 2019). In trypanosomatids, SQ109 interferes with Ca^{2+} uptake by acidocalcisomes (Veiga-Santos et al., 2015) and also collapses the mitochondrial electrochemical potential ($\Delta\Psi_m$) in these parasites (García-García et al., 2016; Gil et al., 2020; Veiga-Santos et al., 2015). These two effects on these organelles, which are both involved in the bioenergetics and Ca^{2+} homeostasis in trypanosomatids, are accompanied by a large increase in the intracellular Ca^{2+} concentration, postulated to be one of the main

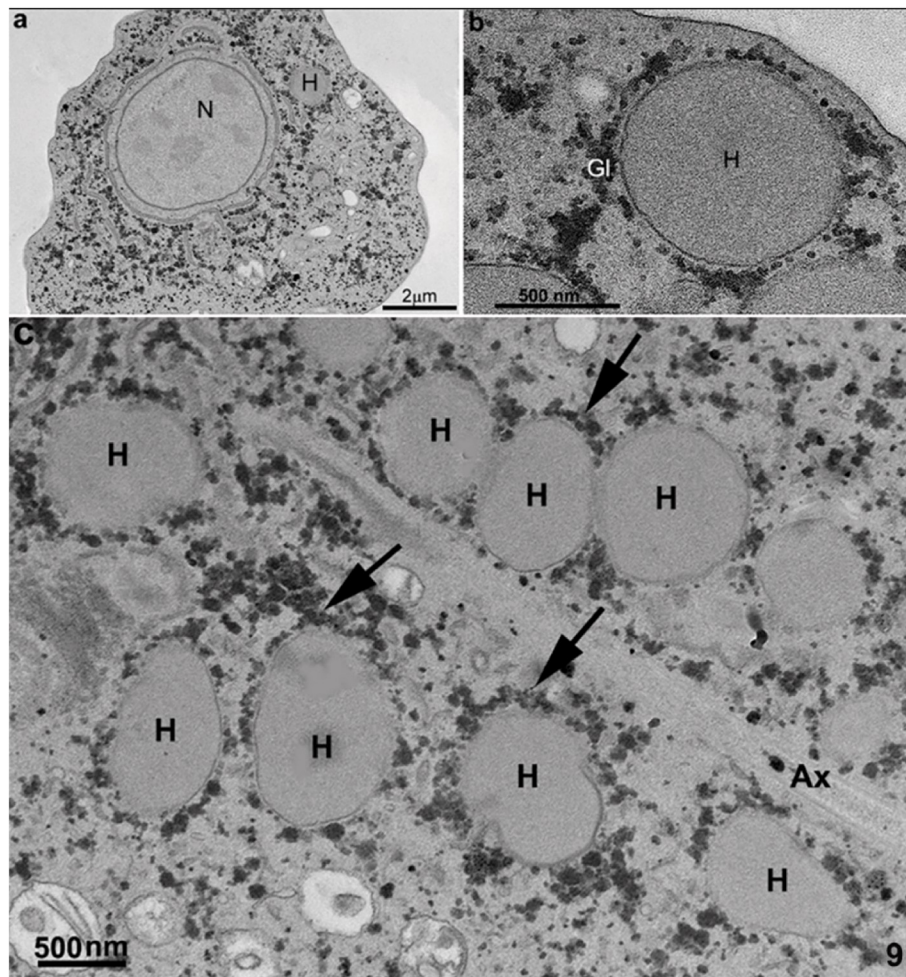


Fig. 9. Transmission electron microscopy after Thie'ry technique for carbohydrate detection in *Trichomonas vaginalis* treated with 10 μ M SQ109 for 24 h. A positive reaction is observed in glycogen particles (Gl) and cell membranes.

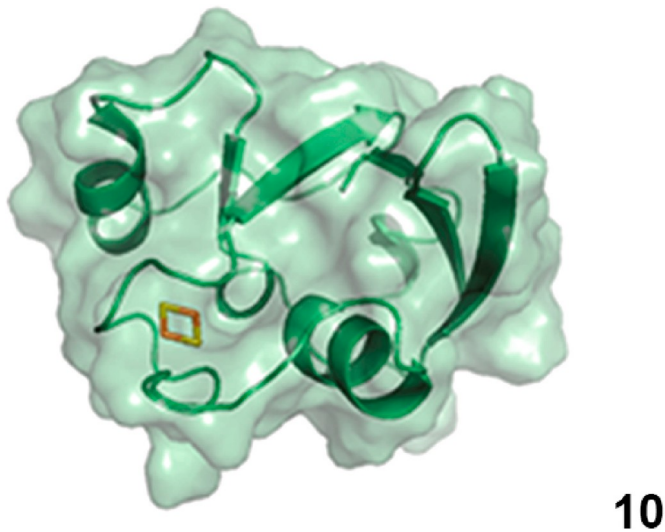


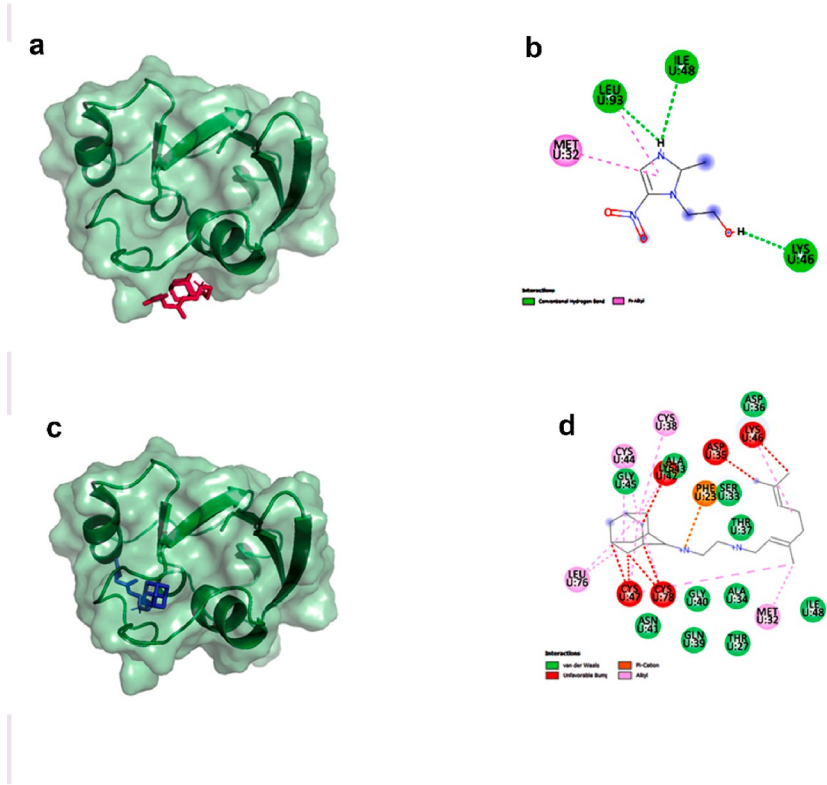
Fig. 10. TvFd (green) with its natural ligand [2Fe-2S] (yellow and orange) positioned in the active site of the A-chain of the protein, PBD code 1L5P, 2.20 Å (Image generated and colored by PYMOL).

causes of parasitic death (Benaim et al., 2020).

3.5. Molecular docking

Given the preliminary bioinformatic analyses predicting the ferredoxin protein of *T. vaginalis* (TvFd) as a potential target for SQ 109 and Metronidazole, we decided to conduct further analysis using molecular docking simulation. A redocking process was performed between the crystal of the protein and its natural ligand, the [2Fe-2S] complex, to determine the interaction residues and thus identify the position and size of the grid box as well as verify the affinity energy between the molecules and finally compare these results with those of the docking simulation between TvFd and the compounds SQ109 and MTZ. Fig. 10 shows the structure of TvFd and its natural coupled ligand.

The redocking results showed that the lowest interaction energy of TvFd and [2Fe-2S] was -2.0 kcal/mol, and it is known it interacts with Phe23, Asp36, Thr37, Cys38, Gln39, Asn41, Lys42, Cys44, Lys46, Cys47, Phe66, Cys78, Leu76 (Crossnoe et al., 2002). Then, the coupling simulation between the TvFd crystal and the compounds MTZ and SQ109 was performed with the same parameters used for redocking. The interaction energy of MTZ with TvFd was -3.8 kcal/mol (in its best pose). The residues that participated in the interaction were Met32, Lys46, Ile48, and Leu93 (Fig. 11B). Whereas the interaction energy of compound SQ109 with TvFd was -4.6 kcal/mol (in its best pose) and the amino acids were Phe23, Thr27, Met32, Ser33, Ala34, Asp35, Asp36, Thr37, Cys38, Gln39, Gly40, Asn41, Lys42, Ala43, Cys44, Gly45, Lys46, Cys47, Ile48, Leu76, Cys78. The types of interactions between the ligands and



11

Fig. 11. Interaction residues between TvFd and the compounds MTZ (11 A) – interactions with Met32, Lys46, Ile48 e Leu93 (11 B); and SQ109 (11C)– interactions with Phe23, Thr27, Met32, Ser33, Ala34, Asp35, Asp36, Thr37, Cys38, Gln39, Gly39, Gly40, Asn41, Lys42, Ala43, Cys44, Gly45, Lys46, Cys47, Ile48, Leu76, Cys78 (11D). Images generated by PYMOL and DISCOVERY STUDIO 2021.

Table 1
Values of the interaction energies between the residues (in their best pose) and the residues of the TvFd protein with which the ligands interact.

	[2Fe2S]	Metronidazol	SQ109
Energy (kcal/mol)	−2,0	−3,8	−4,6
Phe23	X		X
Thr27			X
Met32		X	X
Ser33			X
Ala34			X
Asp35			X
Asp36	X		X
Thr37	X		X
Cys38	X		X
Gln39	X		X
Gly40			X
Asn41	X		X
Lys42	X		X
Ala43			X
Cys44	X		X
Gly45			X
Lys46	X	X	X
Cys47	X		X
Ile48		X	X
Phe66	X		
Leu76	X		X
Cys78	X		X
Leu93		X	

the protein are identified in Fig. 11

These results showed that the compounds MTZ and SQ109 show the highest affinity for the residues in the active site of TvFd, where the [2Fe2S] complex naturally binds. MTZ, even with grid box determination, does not remain in the same site as the [2Fe2S] complex, not competing for the same residues, having only one amino acid in common

(Lys46). On the other hand, compound SQ109 shows a higher affinity for TvFd than the other two ligands, interacting with the protein with a greater number of amino acids, competing for 11 of the 13 amino acids with which the [2Fe2S] complex interacts. Since the two compounds do not compete for the same residues, it is possible that the association of both may have additive effects, thus requiring further studies.

For better visualization and interpretation of the results, Table 1 was generated. In this table, we can observe the value of the interaction energies between the residues (in their best pose) and the residues of the TvFd protein with which the ligands interact.

4. Conclusions

Our results indicate that SQ109 inhibits *T. vaginalis* growth at low concentrations and induces morphological changes that lead to parasite death. These changes include an increased volume of hydrogenosomes, as shown by morphometrical analysis, and inhibit hydrogenosome membrane potential, as evaluated by the JC1 labeling dye. These data suggest the hydrogenosome is a potential target for SQ109 in *T. vaginalis*. In addition, molecular docking analysis point to ferredoxin, which mediated electron transport resulting in the production of molecular hydrogen (review in Kulda, 1999), as a potential target for SQ109 and with higher affinity to ferredoxin than metronidazole.

Funding

This work has been supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (GRANT number E—26/200.956/2021), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas.

Ethics statements

No ethics statements.

Declaration of competing interest

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

We thank CENABIO and Prof. Antonios Kolocouris from the Department of Pharmacy, University of Athens, Greece, and Prof. Eric Oldfield from the Department of Chemistry, the University of Illinois at Urbana-Champaign, USA) who gently provided the compound.

References

- Baek, K.H., Phan, T.N., Malwal, S.R., Lee, H., Li, Z.-H., Moreno, S.N.J., Oldfield, E., No, J. H., 2022. In vivo efficacy of SQ109 against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma spp.* and *Toxoplasma gondii* and in vitro activity of SQ109 metabolites. *Biomedicines* 10, 670. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030670>.
- Benaïm, G., Paniz-Mondolfi, A.E., Sordillo, E.M., Martinez-Sotillo, N., 2020. Disruption of intracellular calcium homeostasis as a therapeutic target against *Trypanosoma cruzi*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00046>.
- Benchimol, M., Bernardino, M., 2002. Ultrastructural localization of glycoconjugates in *Trichomonas foetus*. *Parasitol. Res.* 88, 134–143. <https://doi.org/10.1007/s004360100466>.
- Benchimol, M., Gadelha, A.P., de Souza, W., 2022. Unusual cell structures and organelles in *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* are potential. *Drug Targets. Microorganisms* 10 (11), 2176. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112176>. PMID:36363768. PMCID: PMC9698047.
- Crossnoe, C.R., Germanas, J.P., LeMagueres, P., Mustata, G., Krause, K.L., 2002. The crystal structure of *Trichomonas vaginalis* ferredoxin provides insight into metronidazole activation. *J. Mol. Biol.* 318 (2), 503–518. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00051-7).
- Dallakyan, S., Olson, A.J., 2015. Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods Mol. Biol.* 1263, 243–250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19.
- De Andrade Rosa, I., Rocha, D.A.S., de Souza, W., Urbina, J.A., Benchimol, M., 2011. Ultrastructural alterations induced by $\Delta 24(25)$ -sterol methyltransferase inhibitors on *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 315, 72–78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02178.x>.
- Diamond, L.S., 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 43, 488–490.
- Edwards, D.I., 1993. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. Mechanism of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 31, 9–20. <https://doi.org/10.1093/jac/31.1.9>.
- García-García, V., Oldfield, E., Benaïm, G., 2016. Inhibition of *Leishmania mexicana* growth by the tuberculosis drug SQ109. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 6386–6389. <https://doi.org/10.1128/AAC.00945-16>.
- Gil, Z., Martinez-Sotillo, N., Pinto-Martinez, A., Mejias, F., Martinez, J.C., Galindo, I., Oldfield, E., Benaïm, G., 2020. SQ109 inhibits proliferation of *Leishmania donovani* by disruption of intracellular Ca^{2+} homeostasis, collapsing the mitochondrial electrochemical potential ($\Delta\psi_m$) and affecting acidocalcisomes. *Parasitol. Res.* 119, 649–657. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06560-y>.
- Hashemi, N., Ommi, D., Kheyri, P., Khamesipour, F., Setzer, W.N., Benchimol, M., 2021. A review study on the anti-trichomonas activities of medicinal plants. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 15, 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.01.002>.
- Jurru, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L.E., Brookes, D.H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D.W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D.R., Nielsen, J.E., Head-Gordon, T., Geng, W., Krasny, R., Wei, G.W., Holst, M.J., McCammon, J.A., Baker, N.A., 2018. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci.* 27, 112–128. <https://doi.org/10.1002/pro.3280>.
- Küng, E., Fürnkranz, U., Walochnik, J., 2019. Chemotherapeutic options for the treatment of human trichomoniasis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 53, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.10.016>.
- Kulda, J., 1999. Trichomonads hydrogenosomes and drug resistance. *Int. J. Parasitol.* 29 (2), 199–212. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00155-6). PMID: 10221623.
- Kreisel, K.M., Spicknall, I.H., Gargano, J.W., Lewis, F.M.T., Lewis, R.M., Markowitz, L.E., Roberts, H., Johnson, A.S., Song, R., St Cyr, S.B., Weston, E.J., Torrone, E.A., Weinstock, H.S., 2021. Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2018. *Sex. Transm. Dis.* 48, 208–214. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000001355>.
- Lewis, D.A., 2010. Trichomoniasis. *Medicine (Baltimore)* 38, 291–293. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2010.03.007>.
- Lossick, J.G., 1990. Treatment of sexually transmitted vaginosis/vaginitis. *Clin. Infect. Dis.* 12, S665–S681. https://doi.org/10.1093/clinids/12.Supplement_6.S665.
- Midlej, V., Rubim, F., Villarreal, W., Martins-Duarte, E., Navarro, M., de Souza, W., Benchimol, M., 2019. Zinc-clotrimazole complexes are effective against *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology* 146, 1206–1216. <https://doi.org/10.1017/S003118201900043X>.
- Mielczarek, E., Blaszowska, J., 2016. *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. *Infection* 44, 447–458. <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0860-0>.
- Noel, C.J., Diaz, N., Sicheritz-Ponten, T., Safarikova, L., Tachezy, J., Tang, P., Fiori, P.-L., Hirt, R.P., 2010. *Trichomonas vaginalis* vast BspA-like gene family: evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. *BMC Genom.* 11, 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-99>.
- Paulish-Miller, T.E., Augostini, P., Schuyler, J.A., Smith, W.L., Mordechai, E., Adelson, M.E., Gyax, S.E., Secor, W.E., Hilbert, D.W., 2014. *Trichomonas vaginalis* metronidazole resistance is associated with single nucleotide polymorphisms in the nitroreductase genes ntr4 Tv and ntr6 Tv. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 2938–2943. <https://doi.org/10.1128/AAC.02370-13>.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., Garber, G., 1998. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 300–317. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.300>.
- Protopopova, M., Hanrahan, C., Nikonenko, B., Samala, R., Chen, P., Gearhart, J., Einck, L., Nacy, C.A., 2005. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 968–974. <https://doi.org/10.1093/jac/dki319>.
- Reers, M., Smith, T.W., Chen, L.B., 1991. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 4480–4486. <https://doi.org/10.1021/bi00232a015>.
- Rein, M.F., 1990. Clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in women. In: *Trichomonads Parasitic in Humans*. Springer New York, New York, NY, pp. 225–234. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3224-7_11.
- Sutcliffe, S., Giovannucci, E., Alderete, J.F., Chang, T.H., Gaydos, C.A., Zenilman, J.M., De Marzo, A.M., Willett, W.C., Platz, E.A., 2006. Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 939–945. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0781>.
- Van Der Pol, B., Kwok, C., Pierre-Louis, B., Rinaldi, A., Salata, R.A., Chen, P., van de Wijgert, J., Mmoro, F., Mugerwa, R., Chipato, T., Morrison, C.S., 2008. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *J. Infect. Dis.* 197, 548–554. <https://doi.org/10.1086/526496>.
- Veiga-Santos, P., Li, K., Lameira, L., de Carvalho, T.M.U., Huang, G., Galizzi, M., Shang, N., Li, Q., Gonzalez-Pacanoska, D., Hernandez-Rodriguez, V., Benaïm, G., Guo, R.-T., Urbina, J.A., Do campo, R., de Souza, W., Oldfield, E., 2015. SQ109, a new drug lead for chagas disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1950–1961. <https://doi.org/10.1128/AAC.03972-14>.
- Vilela, R., Menna, Barreto, R.F., Benchimol, M., 2010. Methyl jasmonate induces cell death and loss of hydrogenosomal membrane potential in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Int.* 3, 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.05.003>.
- Zhang, B., Li, J., Yang, Xiaolin, Wu, L., Zhang, J., Yang, Y., Zhao, Y., Zhang, L., Yang, Xiuna, Yang, Xiaobao, Cheng, X., Liu, Z., Jiang, B., Jiang, H., Guddat, L.W., Yang, H., Rao, Z., 2019. Crystal structures of membrane transporter Mmpl3, an anti-tb drug target. *Cell* 176, 636–648. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.003>.