



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TUANNE DOS SANTOS MELO

**IDENTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A AMILOIDES FUNCIONAIS
NO PROTISTA *Trichomonas vaginalis*: IMPLICAÇÕES NA BIOLOGIA DO
PARASITO E NA INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO**

**RECIFE
2020**

TUANNE DOS SANTOS MELO

**IDENTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A AMILOIDES FUNCIONAIS
NO PROTISTA *Trichomonas vaginalis*: IMPLICAÇÕES NA BIOLOGIA DO
PARASITO E NA INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof.^a. Dra. Regina Célia Bressan de Queiroz Figueiredo

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Pereira das Neves Neto

RECIFE

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Melo, Tuarne dos Santos

Identificação de estruturas semelhantes a amiloides funcionais no protista *Trichomonas vaginalis*: implicações na biologia do parasito e na interação com o hospedeiro / Tuarne dos Santos Melo - 2020.

126 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Regina Célia Bressan de Queiroz Figueiredo

Coorientador: Antonio Pereira das Neves Neto

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Tricomoníase 2. Interação parasito-hospedeiro 3. Amiloides
I. Figueiredo, Regina Célia Bressan de Queiroz (Orientadora)
II. Neves Neto, Antonio Pereira das (Coorientador) III. Título

616.951 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-235

TUANNE DOS SANTOS MELO

**IDENTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A AMILOIDES FUNCIONAIS
NO PROTISTA *Trichomonas vaginalis*: IMPLICAÇÕES NA BIOLOGIA DO
PARASITO E NA INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr^a. Regina Célia Bressan de Queiroz Figueiredo (Orientadora)
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz Pernambuco

Prof.^a. Dra. Christina Alves Peixoto (Examinador Interno)
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz Pernambuco

Dra. Karina Lidianne Alcântara Saraiva (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz Pernambuco

À minha mãe Jaqueline, a minha avó Candida, a
minha irmã Tayonara por serem exemplos de
coragem, determinação e amor;
Ao amor da minha vida Everson por sua dedicação,
carinho e ser o grande apoiador dos meus sonhos

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua graça, por me abençoar, me ouvir, e guardar a minha vida, por me sustentar quando eu achava que não ia conseguir durante essa caminhada e por toda a sabedoria liberada para que tudo isso fosse possível até aqui.

Ao meu orientador Dr. Antonio Pereira, por ter me acolhido, por sua paciência mesmo nas horas mais críticas, por toda sua competência e orientação. O senhor é mais que um orientador, é um pai científico que sempre está ao meu lado, me ensina, e também puxa minhas orelhas quando precisa. Eu sei que tudo que o senhor fala e faz por mim é para que eu seja uma profissional brilhante. Agradeço muito a Deus por ter colocado o senhor na minha vida, pois todo esse trabalho só foi possível por sua causa. Muito obrigada!

A minha orientadora Dra. Regina Bressan, por ter me recebido no seu laboratório de braços abertos, por me incentivar sempre a melhorar, pelo seu profissionalismo, por sua orientação e por sempre está disposta a me ajudar. Sou muito a grata Deus pela sua vida. Muito obrigada!

Ao Instituto Aggeu Magalhães–Fiocruz PE, por ter me proporcionado a oportunidade de desenvolver essa pesquisa.

Ao núcleo de plataformas tecnológicas por todo apoio técnico que sempre me proporcionaram. Em especial a Karina Saraiva por tirar as minhas dúvidas e por colaborar com seu conhecimento em relação à microscopia.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas pelo suporte e estrutura física, contribuindo para a minha aprendizagem.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por toda contribuição financeira para que esse trabalho fosse executado. Muito obrigada!

A Dra. Débora Foguel e Dr. Fernando Palhano por toda a contribuição científica nesse trabalho.

A Dra. Natália de Miguel e a Dra Yesica Romina por sua colaboração e contribuição técnico-científica para esta pesquisa.

A Dra. Marlene Benchimol, por ter cedido as cepas para todo o nosso trabalho.

Ao Dr. Ronald Wetzel e ao Dr. Jan Tachezy por ter cedido os anticorpos para a execução dos experimentos.

A Dra Sheilla Andrade por ter sempre disponibilizado a utilização do seu microscópio de fluorescência. Muito obrigada!

A todos os componentes da banca examinadora por terem aceitado o convite.

A Abigail Miranda, por todo o suporte que sempre me deu no laboratório, por todas as vezes que ficou comigo até eu terminar os experimentos, por todas as palavras de conforto nas situações difíceis. Obrigada por todos os momentos divertidos e por se tornar uma grande amiga para mim.

A todos que compõem o laboratório de biologia celular de patógenos e o departamento de microbiologia. Obrigada por todo incentivo e por todo ensinamento.

A Professora Cleide, por sempre estar disposta a ajudar com a escrita.

A minha mãe Jaqueline, a minha avó Candida e a minha irmã Tayonara por se manter como base forte durante toda a trajetória da minha vida acadêmica, por ter sonhado junto comigo sempre e por toda a dedicação e carinho que sempre me proporcionaram.

A Everson, meu namorado e melhor amigo. Agradeço por sempre ter acreditado em mim, mesmo quando eu não acreditava mais, por sempre me ouvir e por todo encorajamento.

A Manoel, por desde o comecinho ter acreditado em mim, e ter contribuído sempre que pode com os seus recursos.

Aos meus amigos Emyllayne Maysa, Isabelle Farias, Larissa Macêdo, Lucas Lima, Rayanne Rodrigues, Tiago Henrique por sua amizade, companheirismo, por sempre me fazerem sorrir mesmo em dias difíceis. Obrigada por todo apoio!

Aos meus pastores, Divino e Angélica Oliveira eu só tenho a agradecer por cada dia que vocês intercederam pela minha vida, orando para que tudo desse certo.

As grandes ideias surgem da
observação dos pequenos detalhes.

Augusto Cury

RESUMO

Amiloides são agregados proteicos organizados em fibrilas ricas em fitas-beta e associados a doenças neurodegenerativas. Contudo, amiloides podem também exercer importantes funções biológicas, sendo denominados amiloides funcionais. Em microrganismos, amiloides funcionais atuam como fatores de citoaderência. Nesse contexto, o presente estudo teve como foco identificar amiloides funcionais em *Trichomonas vaginalis*, causador da tricomoníase humana. A citoaderência é um pré-requisito para o estabelecimento do parasito no trato urogenital. Ao entrar em contato com células hospedeiras, *T. vaginalis* pode assumir uma morfologia ameboide e formar *clusters*. Estas transformações são relacionadas com a patogenicidade, uma vez que há aumento de expressão de proteínas associadas à citoaderência. No presente trabalho, utilizamos marcadores clássicos de amiloides (tioflavina S [ThS], vermelho do Congo e anticorpos anti-amiloides), através de ensaios morfológicos e ultraestruturais, com o objetivo de identificar estruturas semelhantes aos amiloides em duas cepas de *T. vaginalis*, uma mais e outra menos citoaderente. Realizamos ensaios funcionais visando estabelecer uma correlação das estruturas semelhantes aos amiloides com os processos de: (a) transformação ameboide; (b) formação de *clusters*; e (c) interação parasito-levedura e parasito-célula hospedeira. Técnicas de bioinformática também foram aplicadas com intuito de: (a) identificar quais proteínas envolvidas na citoaderência de *T. vaginalis* apresentariam potencial amiloidogênico; e (b) estabelecer uma correlação com os resultados dos ensaios morfológicos e funcionais. Com exceção do vermelho do Congo que gerou resultados negativos, os demais marcadores apresentaram reação positiva em estruturas celulares de *T. vaginalis* relacionadas direta (superfície celular e vesículas extracelulares) e indiretamente (complexo de Golgi, corpos multivesiculares e hidrogenossomos) com a interação com o hospedeiro. Além disso, ThS foi mais sensível em detectar estruturas semelhantes aos amiloides na cepa mais citoaderente de *T. vaginalis*. Análises *in silico* revelaram que proteínas envolvidas na citoaderência de *T. vaginalis* tais como as adesinas AP51, AP53, AP65, tetraspaninas, cisteíno-proteinases leguminaína-like, adesinas BspA-like e a proteína variante de superfície P270 possuem alto potencial amiloidogênico. Dados da literatura mostram que estas proteínas estão localizadas nas mesmas organelas onde encontramos marcação para amiloides. Observamos um aumento de marcação para amiloides em *T. vaginalis* na morfologia

ameboide, nos *clusters* de parasitos e após interação com leveduras e células hospedeiras. Resultados prévios mostram que a expressão exógena de tetraspanina 8 (TvTSP8) de *T. vaginalis* está associada com a formação de *clusters* celulares. No presente estudo, nós identificamos *in silico* uma região amiloidogênica de TvTSP8 e construímos um mutante com um menor potencial previsto de agregação amiloide. Nossos resultados mostraram uma redução no número de clusters nos parasitos que expressavam a proteína mutante. Portanto, os resultados do presente estudo indicam que *T. vaginalis* possui estruturas semelhantes aos amiloides funcionais e que estas estariam relacionadas, pelo menos em parte, com os processos de interação parasito-hospedeiro, parasito-levedura, formação de clusters e transformação ameboide.

Palavras-chave: Agregação. Amiloides funcionais. Interação parasito-hospedeiro. Tricomoníase. *Trichomonas vaginalis*.

ABSTRACT

Amyloids are aggregates of proteins organized in beta-sheets-rich fibrils, and are associated with neurodegenerative diseases. However, amyloids can also have important biological functions, being called functional amyloids. In microorganisms, functional amyloids act as cytoadherence factors. In this context, the present study focused on identifying functional amyloids in *Trichomonas vaginalis*, which causes human trichomoniasis. Cytoadherence is a prerequisite for the establishment of the parasite in the urogenital tract. Upon contact with host cells, *T. vaginalis* can assume an amoeboid morphology and form clusters. These transformations are related to pathogenicity, since there is an increase in the expression of proteins associated with cytoadherence. In the present study, classic amyloid markers were employed (thioflavin S [ThS], Congo red and anti-amyloid antibodies), through morphological and ultrastructural assays, with the aim of identifying structures similar to amyloid in two strains of *T. vaginalis*, one more and one less cytoadherent. Functional tests were performed in order to establish a correlation of structures similar to amyloid with the following processes: (a) amoeboid transformation; (b) formation of clusters; and (c) parasite-yeast and parasite-host cell interaction. Bioinformatics techniques were also applied in order to: (a) identify which proteins involved in the cytoadherence of *T. vaginalis* would have amyloidogenic potential; and (b) establish a correlation with the results of the morphological and functional tests. With the exception of Congo red that generated negative results, the other markers showed a positive reaction in *T. vaginalis* cell structures related directly (cell surface and extracellular vesicles) and indirectly (Golgi complex, multivesicular bodies and hydrogenosomes) with the interaction with the host. Besides, ThS was more sensitive in detecting structures similar to amyloid in the strain of *T. vaginalis* with more cytoadherence. *In silico* analyzes revealed that proteins involved in the cytoadherence of *T. vaginalis* such as the AP51, AP53, AP65 adhesins, tetraspanins, legumain-like cysteine proteinases, BspA-like adhesins and the surface variant protein P270 have high amyloidogenic potential. Literature data show that these proteins are located in the same organelles where we found labeling of amyloid. We observed an increase in amyloid labeling in *T. vaginalis* in amoeboid morphology, in parasite clusters and after interaction with yeasts and host cells. Previous results show that the exogenous expression of tetraspanin 8 (TvTSP8) of *T. vaginalis* is associated with the formation of cell clusters.

In the present study, an amyloidogenic region of TvTSP8 was identified *in silico* and then a mutant with a lower expected amyloid aggregation potential was constructed. Our results showed a reduction in the number of clusters in the parasites that expressed the mutant protein. Therefore, the results of the present study indicate that *T. vaginalis* has structures similar to functional amyloids and that these are related, at least in part, to the processes of parasite-host, parasite-yeast interaction, clusters formation and ameboid transformation.

Keywords: Aggregation. Functional amyloids. Parasite-host interaction. Trichomoniasis. *Trichomonas vaginalis*.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 –	Representação esquemática de <i>T. vaginalis</i> destacando as principais organelas e estruturas celulares.....	23
Figura 2 –	Representação esquemática do ciclo de <i>T. vaginalis</i>	25
Figura 3 –	Visão geral das diferentes morfologias de <i>T. vaginalis</i> por microscopia eletrônica.....	27
Figura 4 -	Microtúbulos do axóstilo em associação com glicogênio de <i>Trichomonas foetus</i> visto por microscopia eletrônica de transmissão.....	37
Figura 5 –	Formação de extensos agregados celulares (<i>clusters</i>) entorno da célula epitelial vaginal observado por microscopia eletrônica de varredura.....	41
Figura 6 –	Representação esquemática da formação do agregado amiloide.....	42
Figura 7 –	Formação estrutural das fibras amiloides.....	43
Figura 8 –	Representação esquemática da formação da fibra amiloide em uma polimerização dependente de nucleação.....	44
Figura 9 –	Fibras amiloides típicas.....	44
Figura 10 –	Padrão de difração de raio-x das fibras amiloides.....	46
Figura 11 –	Nanofibras RADA16-I coradas com tioflavina-T.....	47

Artigo

Figura 1 –	Cepa FMV1 de <i>T. vaginalis</i> não permeabilizada e permeabilizada marcada com ThS.....	65
Figura 2 –	Cepa Jt de <i>T. vaginalis</i> não permeabilizada e permeabilizada marcada com ThS.....	66
Figura 3 –	Ensaio de dupla marcação em <i>T. vaginalis</i> com ThS e anti-PFOR.....	67
Figura 4 –	Ensaio de dupla marcação em <i>T. vaginalis</i> com ThS e anti-enzima Málica.....	68

Figura 5 –	Parasitos na forma ameboide e <i>clusters</i> celulares marcados com ThS.....	70
Figura 6 –	Agregados amiloides da proteína α -sinucleína marcadas com anti-LOC, anti-W01 e anti-W02.....	74
Figura 7 –	<i>T. vaginalis</i> não permeabilizada e tratadas antes da fixação marcadas com anti-LOC.....	75
Figura 8 –	<i>T. vaginalis</i> permeabilizadas marcadas com anti-LOC.....	76
Figura 9 –	Imunocitoquímica ultraestrutural de <i>T. vaginalis</i> com anti-LOC.....	77
Figura 10 –	Imunocitoquímica ultraestrutural de <i>T. vaginalis</i> com anti-LOC marcando estruturas semelhantes a fibras e VEs.....	78
Figura 11 –	Imunocitoquímica ultraestrutural de amostras purificadas de VEs de <i>T. vaginalis</i> com anti-LOC.....	79
Figura 12 –	<i>T. vaginalis</i> marcada com os anticorpos anti-W0.....	80
Figura 13 –	Imunocitoquímica ultraestrutural de <i>T. vaginalis</i> com os anticorpos anti-W0.....	81
Figura 14 –	Ensaio de dupla marcação de <i>T. vaginalis</i> com anti-LOC e anti-W02.....	82
Figura 15 –	Ensaio de dupla marcação de <i>T. vaginalis</i> ThS e anti-W0.....	83
Figura 16 –	Interação <i>Trichomonas</i> -levedura com ThS.....	85
Figura 17 –	Interação <i>Trichomonas</i> -célula-hospedeira com ThS.....	86
Figura 18 –	Representação esquemática da estrutura típica e análise das sequências das TSPs.....	89
Figura 19 –	Mutação na sequência amiloidogênica de TvTSP8 interfere na formação de <i>clusters</i>	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas presentes em <i>T. vaginalis</i> e suas respectivas funções.....	32
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	angström
β	Beta
μm	Micrômetro
Acetil-coA	Acetil-coenzima A
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ATP	Trifosfato de adenosina
CPs	Cisteíno-proteinases
CRES	Subgrupo epididimático de espermatogênese
FDA	Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GH	Hormônio do Crescimento
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papilomavírus humano
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MSP2	Proteína de superfície 2
MSP3	Proteína de superfície 3
MVs	Microvesículas
NAAT	Testes de Amplificação de Ácido Nucleico
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFOR	Piruvato ferredoxina oxidoreductase

pH	Potencial hidrogeniônico
PMEL	Células pigmentares
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
ThS	tioflavina-S
ThT	tioflavina-T
TIM	Triosefosfato isomerase
<i>T. vaginalis</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
TVTSPs	Tetraspaninas de <i>Trichomonas vaginalis</i>
VEs	Vesículas extracelulares

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS.....	22
1.1.1	Objetivo geral.....	22
1.1.2	Objetivos específicos.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	CLASSIFICAÇÃO.....	23
2.2	ASPECTOS GERAIS DE <i>T. vaginalis</i>	24
2.3	EPIDEMIOLOGIA, SINTOMATOLOGIA E IMPORTÂNCIA MÉDICA.....	28
2.4	DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	29
2.5	BIOLOGIA CELULAR.....	31
2.5.1	Superfície celular.....	31
2.5.2	Hidrogenossomos	33
2.5.3	Retículo endoplasmático	34
2.5.4	Complexo de Golgi e filamentos parabasais.....	34
2.5.5	Vesículas intracelulares e Lisossomos.....	34
2.5.6	Vesículas extracelulares.....	35
2.5.7	Citoesqueleto.....	36
2.5.8	Núcleo.....	37
2.6	INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO.....	37
2.7	AMILOIDES.....	41
2.7.1	Definição, estrutura e características.....	41
2.7.2	Técnicas para identificação de amiloides.....	45
2.7.3	Amiloides funcionais	49
2.7.3.1	Amiloides funcionais em humanos.....	50
2.7.3.2	Amiloides funcionais em bactérias.....	50
2.7.3.3	Amiloides funcionais em fungos.....	51
2.7.3.4	Amiloides funcionais em protozoários.....	52
2.7.3.5	Importância de estudar amiloides funcionais.....	52
3	ANÁLISE MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A AMILOIDES FUNCIONAIS EM <i>Trichomonas vaginalis</i>.....	54

4	CONCLUSÕES	112
	REFERÊNCIAS.....	113

1 INTRODUÇÃO

Trichomonas vaginalis é o causador da tricomoníase humana, a infecção sexualmente transmissível (IST) não viral mais comum em todo planeta (WHO, 2018). A infecção ocorre no trato urogenital, sendo mais frequente no sexo feminino. A tricomoníase apresenta como os principais sintomas nas mulheres: prurido, corrimento vaginal de odor fétido, irritação na mucosa, disúria e secreção vaginal espumosa (HIRT; SHERRARD, 2015). Além disso, a doença está associada a danos mais severos como doença inflamatória pélvica, e infertilidade (CHERPES et al., 2006; SILVER et al., 2014). Em gestantes, pode implicar em várias complicações no pré e pós-natal (SILVER et al., 2014; MIELCZAREK; BLASZKOWSKA, 2016). A tricomoníase predispõe também ao (1) câncer cervical (GHOSH et al., 2017); (2) aumento do risco de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (KISSINGER; ADAMSKI, 2013); (3) aumento do risco de ter a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) (DONDERS et al., 2013); (4) aumento de contágio de doenças bacterianas e fúngicas (TWU et al., 2014; MERCER; JOHNSON, 2018); e (5) maior incidência de adquirir o vírus herpes simplex II (GOTTLIEB et al., 2004). Nos homens, *T. vaginalis* geralmente é assintomática, porém pode causar alguns danos como: uretrite, prostatite e infertilidade (MERCER; JOHNSON, 2018; SECOR, 2012). Além disto, a tricomoníase também é associada ao aumento do risco de desenvolver câncer de próstata (SUTCLIFFE et al., 2006; BARDAN et al., 2014; KISSINGER, 2015; MERCER; JOHNSON, 2018).

Embora *T. vaginalis* seja reconhecido como um dos mais comuns agentes infecciosos, os processos envolvidos na interação tricomonas-célula hospedeira ainda não foram totalmente esclarecidos. Para que ocorra a infecção é necessária a adesão de *T. vaginalis* sobre a célula hospedeira, sendo assim a citoaderência um pré-requisito para o estabelecimento e manutenção do parasito no trato urogenital humano. A infecção é constituída por um processo complexo e multifatorial dependente de tempo, temperatura, pH, íons ferro e que envolve a participação dos fatores de virulência e ambientais (MERCER; JOHNSON, 2018).

À parte do seu interesse médico, as tricomonas apresentam aspectos únicos na sua organização celular. Além das organelas encontradas em células eucarióticas, como núcleo, retículo endoplasmático, *T. vaginalis* possui estruturas atípicas das quais poucas informações são conhecidas, tais como: (1) hidrogenossomos,

organelas de origem endossimbiótica relacionada às mitocôndrias; (2) complexo pelta-axóstilo, uma estrutura estável, composta por microtúbulos; (3) costa, uma estrutura proteica estriada; (4) filamentos parabasais, estruturas estriadas associadas ao complexo de Golgi, dentre outros (BENCHIMOL, 2004).

Quando cultivadas em meio axênico ou estão se locomovendo livremente, *T. vaginalis* exibe um corpo celular piriforme com quatro flagelos anteriores e um flagelo recorrente associado à membrana ondulante. Após o contato com suas célula-alvo ou algum outro tipo de substrato, o parasito assume uma morfologia ameboide, que adere firmemente ao tecido do hospedeiro (BENCHIMOL et al., 2015).

T. vaginalis pode também formar aglomerados celulares (*clusters*) entre os parasitos ao entrarem em contato com células hospedeiras. As formas ameboides e os agregados celulares são positivamente correlacionados com a virulência do parasito por apresentarem uma maior superfície de adesão e um aumento de expressão de adesinas na superfície celular. Além disso, as formas ameboides e os agregados de parasitos podem liberar moléculas quimiotáticas que atraem mais parasitos para o sítio de infecção, causando maiores danos aos tecidos hospedeiros. (HIRT, 2013; BENCHIMOL et al., 2015).

Dentro desse contexto, amiloides são agregados de proteínas que se caracterizam por exibirem uma estrutura organizada em fibrilas rica em fitas beta. Os amiloides têm sido relacionados a doenças neurodegenerativas como, Alzheimer, Parkinson e doença de Huntington (CHITI; DOBSON, 2017). Antigamente, os amiloides eram apenas associados a patologias, mas está cada vez mais claro que a propensão a formar fibrilas amiloides é uma propriedade genérica de virtualmente todas as proteínas (CAO; MEZZENGA, 2019).

Existem amiloides que são produzidos pelas células de maneira altamente controlada agindo de forma benéfica, estes são chamados de amiloides funcionais, que podem ser encontrados em uma variedade de organismos, de bactérias a mamíferos (PHAM et al., 2014; JAIN; CHAPMAN, 2019), como por exemplo: Em *Streptomyces* foi visto que os amiloides participam da formação de hifas aéreas durante a morfogênese de esporos (YANG et al., 2017); em *Candida albicans* as fibras amiloides são responsáveis pela adesão, agregação célula-célula e substratos (CHAN; LIPKE, 2014), em humanos foram observados que os amiloides exercem papel funcional para a síntese de melanina (FOWLER et al., 2005). Diante disso,

estudos sobre amiloides em microrganismos vêm ganhando maior importância nos últimos anos devido ao seu papel nas interações célula-célula e como fatores de citoadesão para o estabelecimento de patógenos nos hospedeiros (JAIN; CHAPMAN, 2019). O nosso grupo iniciou e vem investigando a presença de amiloides funcionais em *T. vaginalis*, que é o objeto de estudo dessa dissertação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Identificar a presença de estruturas semelhantes a amiloides funcionais em *T. vaginalis* com ênfase nas suas possíveis participações nos mecanismos de citoaderência e formação de agregados celulares

1.1.2 Objetivos específicos

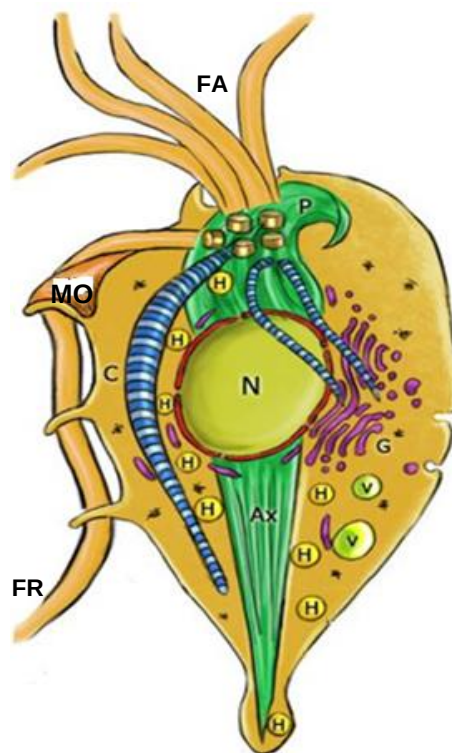
- a) Demonstrar a presença de amiloides utilizando marcadores fluorescentes específicos e ensaios de imunomarcacão;
- b) Verificar a participação de estruturas semelhantes a amiloides durante:
 - 1 - Transformação ameboide do parasito
 - 2 - Formação de agregados celulares de *T. vaginalis*;
 - 3 - A interação *in vitro* de *T. vaginalis* com células epiteliais vaginais e leveduras
- c) Identificar no genoma de *T. vaginalis* proteínas de superfície com potencial amiloidogênico;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CLASSIFICAÇÃO

O protista flagelado *Trichomonas vaginalis* (DONNÉ, 1836) pertence ao Subgrupo Metamonada, Filo Parabasalia e a Família Trichomonadidea. Os trichomonadídeos são microrganismos que se caracterizam pela presença de: (1) quatro a seis flagelos, sendo um sempre recorrente e associado a uma membrana ondulante; (2) hidrogenossomos, organela de origem endossimbiótica relacionada às mitocôndrias; (3) um aparato parabasal, que corresponde ao complexo de Golgi com filamentos parabasais associados e (4) um complexo pelta-axóstilo, que é formado por um sistema de microtúbulos (BENCHIMOL et al., 2015). Além disso, esses protistas não apresentam peroxissomos e os ribossomos possuem características híbridas de procariotos e eucariotos (LI et al., 2017) (figura 1)

Figura 1. Representação esquemática de *T. vaginalis* destacando as principais organelas e estruturas celulares



Legenda: FA, flagelos anteriores; FR, flagelo recorrente; MO, membrana ondulante; P, pelta; Ax, axóstilo; C, costa; H, hidrogenossomos; V, vesículas; G, complexo de Golgi; N, núcleo.

Fonte: BENCHIMOL, 2010

Dentre os representantes mais conhecidos e estudados desta Família encontram-se *T. vaginalis* (DONNÉ, 1836), parasito do trato urogenital humano e objeto de investigação do presente trabalho; *Tetratrichomonas gallinarum* (MARTIN; ROBERTSON, 1911), parasito da cavidade bucal e do ceco de aves; *Trichomonas tenax*, que habita a cavidade bucal de humanos e cuja patogenicidade ainda é controversa na literatura (SCHWEBKE; BURGESS, 2004; RIBEIRO et al., 2015); *Pentatrichomonas hominis*, comensal que coloniza o trato gastrointestinal de primatas humanos e não humanos, gatos e cães (WENRICH, 1944; MELONI et al., 2011; TOLBERT et al., 2012; LI et al., 2014).

A classificação atual de *T. vaginalis* proposta por BURKI et al. (2019)

Domínio: Eukaryota

Reino: Protista

SubGrupo: Metamonada

Filo Parabasalia

Classe Trichomonadea

Ordem Trichomonadida

Família Trichomonadidae

Subfamília Trichomonadinae

Gênero *Trichomonas*

Espécie *Trichomonas vaginalis*

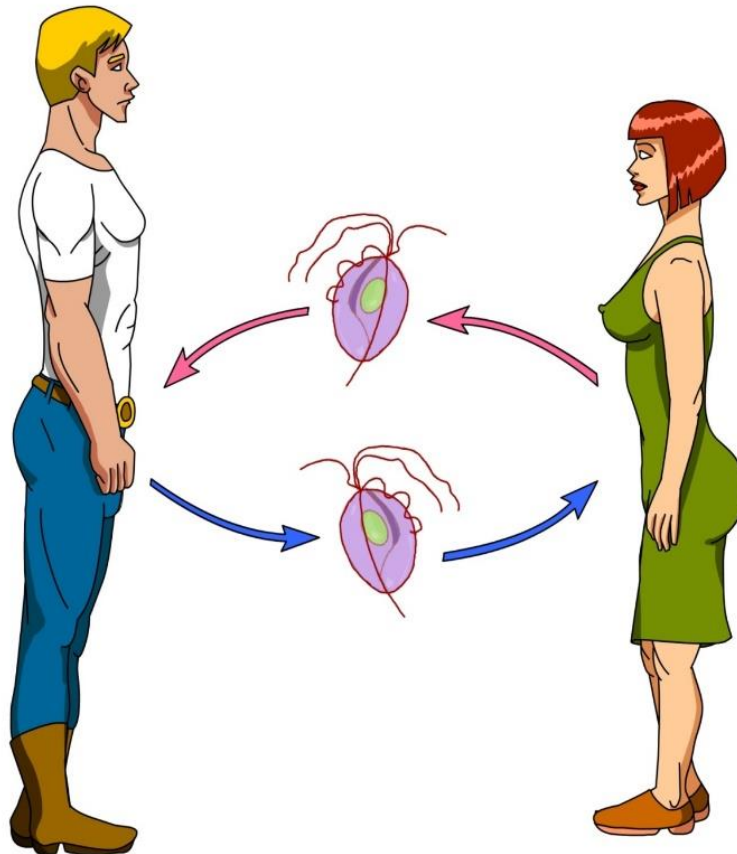
2.2 ASPECTOS GERAIS DE *T. vaginalis*

T. vaginalis é o agente etiológico da tricomoníase humana, a IST não viral mais comum em todo planeta (WHO, 2018). Essa infecção ocorre no trato urogenital, sendo mais frequente em mulheres (figura 2). Trata-se de uma inflamação severa e irritante, resultante de intensificada leucorreia vaginal que é a principal consequência patológica da doença. Desse modo, o efeito inflamatório pode atingir a vulva, a vagina ou o cérvix uterino (SECOR, 2012; MERCER; JOHNSON, 2018).

T. vaginalis foi descrito pela primeira vez por Alfred Donné, isolado de secreções vaginais (DONNÉ, 1836). Quando cultivado em meio axênico, esse parasito é caracterizado microscopicamente por formato oval (piriforme), medindo cerca de 10-19 µm de comprimento e 10 µm de largura no seu eixo maior. Possui quatro flagelos

anteriores e um flagelo recorrente que forma a membrana ondulante (BENCHIMOL et al., 2015).

Figura 2. Representação esquemática do ciclo de *T. vaginalis*



Legenda: Nota-se que o parasito tem um ciclo de vida simples e a transmissão ocorre de forma direta através do contato sexual

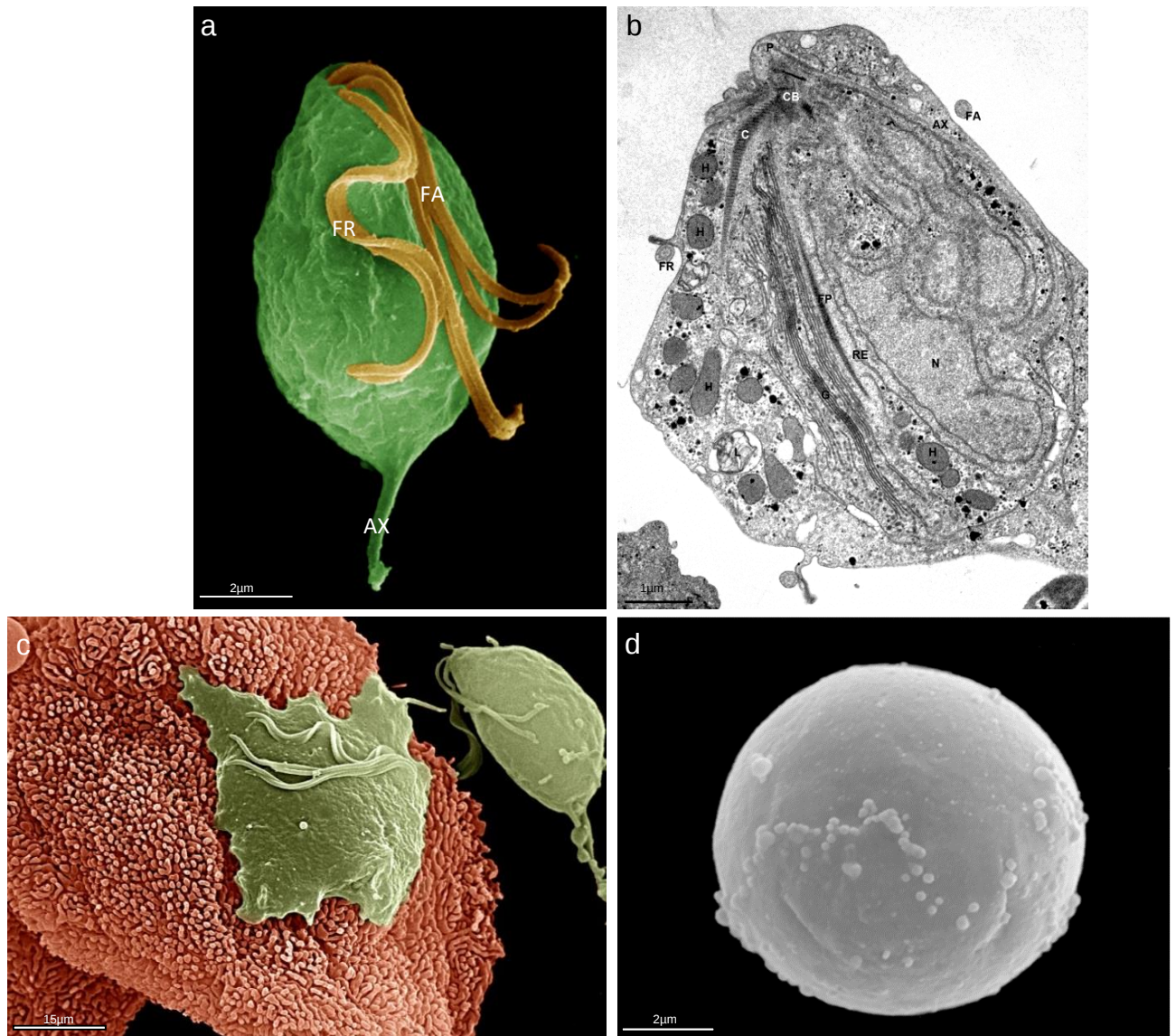
Fonte: Cortesia Benchimol, M.

T. vaginalis é um parasito extracelular que interage com as células epiteliais do trato urogenital humano. A adesão do parasito envolve a interação entre moléculas da sua superfície, tais como adesinas, lipofosfoglicanos, tetraspaninas, proteínas BspA-símile, cisteíno-proteases, dentre outras, com moléculas presentes na superfície das células hospedeiras (FIGUEROA-ÂNGULO et al., 2012; COCERES et al., 2015; MERCER; JOHNSON, 2018). Entretanto, os mecanismos de citotoxicidade envolvidos na interação tricomonas-célula hospedeira ainda não foram totalmente esclarecidos.

Esse parasito tem um ciclo de vida simples apresentando somente a forma de trofozoíto (DIAS-LOPES et al, 2018). Embora seja uma forma única, os trofozoítos de *T. vaginalis* apresentam uma grande plasticidade morfológica: quando cultivadas em meio axênico e se locomovendo livremente, os parasitos apresentam o formato piriforme; ao interagirem com suas células-alvo ou algum outro tipo de substrato, estes microrganismos assumem uma morfologia ameboide (BENCHIMOL et al., 2015). Além disto, *T. vaginalis* também pode apresentar formas arredondadas com flagelos internalizados, muito semelhantes a cistos, porém sem apresentar uma parede cística, sendo denominadas pseudocistos (DIAS-LOPES et al, 2018). (figura 3)

T. vaginalis é haploide, com seis cromossomos e um genoma surpreendentemente extenso e repetitivo, com a capacidade estimada para codificar mais de 60.000 proteínas. Este parasito é um dos eucariotos com o maior genoma conhecido. Dessa forma, *T. vaginalis* é também um interessante modelo para estudos genômicos e evolutivos (CARLTON et al., 2007; BARRATT et al., 2016).

Figura 3. Visão geral das diferentes morfologias de *T. vaginalis* por microscopia eletrônica



Legenda: (a) Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Note os flagelos anteriores (FA), o flagelo recorrente (FR) associado à membrana ondulante e o axóstilo (Ax) formando uma protuberância na região posterior. Barra, 2 μm . (b) Microscopia eletrônica de transmissão (MET). Observe o interior da célula com um único núcleo (N), corpúsculos basais (CB), flagelo anterior (FA), flagelo recorrente (FR), complexo de Golgi (G), filamento parabasal (FP) hidrogenossomos (H), retículo endoplasmático (RE), costa (C), pelta (P), axóstilo (AX) e lisossomo (L). Barra 1 μm (c) MEV de um parasito (verde) apresentando morfologia ameboide após o contato com a célula hospedeira (vermelho). Barra 15 μm (d) MEV de um parasito na morfologia de pseudocisto. Note que a célula se encontra arredondada e sem flagelos visíveis. Barra, 2 μm .

Fonte: Cortesia de Pereira-Neves, A.

2.3 EPIDEMIOLOGIA, SINTOMATOLOGIA E IMPORTÂNCIA MÉDICA

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima cerca de 376 milhões de novos casos de ISTs curáveis não-virais anualmente em todo o mundo (WHO, 2018). Deste total, cerca de 156 milhões se refere apenas a tricomoníase. No Brasil, estima-se que a prevalência desta infecção é em torno de 14,8% da população e o número de novos casos é de 4,3 milhões de pessoas infectadas pelo parasito por ano, uma incidência bem elevada em comparação com outras ISTs não virais (PASSOS, 2006; BRASIL, 2008). Em relação ao estado de Pernambuco, a prevalência da tricomoníase é estimada em cerca de 10,5% da população (LEONCIO et al., 2013).

Este parasito é transmitido principalmente através de relações sexuais (KISSINGER, 2015). Contudo, existem relatos de casos de transmissão através de roupas íntimas, instrumentos ginecológicos e piscinas públicas contaminadas com secreções contendo os parasitos (PEREIRA-NEVES; BENCHIMOL, 2008). A tricomoníase apresenta várias manifestações patológicas que abrange desde um quadro assintomático até um estado severo de inflamação. Os sintomas mais comuns encontrados nas mulheres são: prurido intenso, irritação na mucosa vaginal, corrimento vaginal de odor fétido, disúria e secreção vaginal espumosa (SCHWEBKE et al., 2004;). O efeito inflamatório pode atingir a vulva, vagina ou cérvix uterino (MERCER; JOHNSON, 2018). *Colpitis macularis* ou colo do útero com aspecto de morango é um achado clínico específico para a tricomoníase. Contudo este não é identificado facilmente em exames de rotina, sendo visualizado somente em cerca de 5% das mulheres infectadas, embora a utilização da colposcopia aumente a confiabilidade para quase 50%. (WOLNER-HANSSEN et al., 1989).

Além disso, a tricomoníase está associada a lesões mais graves como doença inflamatória pélvica, (CHERPES et al., 2006, SILVER et al., 2014) e infertilidade. Em gestantes, a tricomoníase pode implicar em predisposição a ruptura das membranas placentárias, parto prematuro, ou ainda levar ao nascimento de crianças de baixo peso, com limitações cognitivas ou doença pulmonar crônica (SILVER et al., 2014; MIELCZAREK; BLASZKOWSKA, 2016). Atualmente, a tricomoníase ganhou maior importância pela OMS, uma vez que a infecção por *T. vaginalis* predispõe ao (1) câncer cervical; (2) aumento da vulnerabilidade à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV); (3) risco duplicado de infecção pelo HPV; (4) risco de infecção com doenças bacterianas e fúngicas (VIKKI et al., 2000; MOODLEY et al.,

2002; KISSINGER; ADAMSKI., 2013; DONDERS et al., 2013; TWU et al, 2014; MERCER; JOHNSON, 2018); e (5) maior incidência de contrair o vírus herpes simplex II (GOTTLIEB et al., 2004).

Nos homens, *T. vaginalis* geralmente é assintomática, mas eventualmente pode causar uretrite, prostatite e infertilidade (SECOR, 2012; MERCER; JOHNSON, 2018). Há alguns anos a tricomoníase tem sido associada a uma maior incidência de um tipo agressivo de câncer de próstata (TWU et al, 2014; MERCER; JOHNSON, 2018). Demonstrou-se que uma proteína secretada por *T. vaginalis* homóloga ao fator de inibição de migração de macrófagos poderia contribuir para o desenvolvimento e progressão desse tipo de câncer (TWU et al., 2014).

2.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico da tricomoníase não deve ser feito baseado somente nos sintomas, uma vez que alguns pacientes são assintomáticos e os sintomas produzidos se assemelham muito com outras infecções (MENEZES et al., 2016). Portanto, faz-se necessário a realização de exames para que o diagnóstico seja confirmado.

O método de diagnóstico tradicional de microscopia ou montagem úmida (DONNÉ, 1836) é realizado em uma lâmina e visualizado em um microscópio óptico. Nesta técnica é analisada a motilidade do parasito (BHESANIA; NARAYANKHEDKAR, 2016; ALLESSIO; NYIRJESY, 2019). O exame de Papanicolaou também pode detectar *T. vaginalis*, possui eficácia para mulheres submetidas a triagem de câncer cervical (HOBBS; SENA, 2013).

A cultura é considerada o padrão ouro para o diagnóstico de *T. vaginalis*. A sensibilidade para a cultura é de aproximadamente 75-96% nas mulheres, com uma especificidade de até 100% (ALLESSIO; NYIRJESY, 2019). No entanto, esta técnica possui algumas limitações como por exemplo a sensibilidade que pode ser menor que 40% nos homens (SEÑA et al., 2014). O método da cultura foi otimizado pelo desenvolvimento do dispositivo InPouch, que está comercialmente disponível (BOUCHEMAL et al., 2017). Este sistema combina cultura e microscopia para fornecer uma solução de diagnóstico que oferece as vantagens de ambos os métodos (SOOD et al., 2008).

O teste Affirm VPIII (BD Dickinson, Sparks, MD) é um teste de hibridização de ácido nucleico que permite a detecção de *T. vaginalis* dentro de 30 a 60 minutos

(BOUCHEMAL et al., 2017). Além da agilidade no resultado, este teste inclui a detecção de *Gardnerella* e *Candida albicans* (HOBBS; SENA, 2013; ALLESSIO; NYIRJESY, 2019). Os testes de amplificação de ácido nucleico (NAAT) estão ganhando força em *T. vaginalis*. O primeiro NAAT para detecção de *T. vaginalis* a ser aprovado pela Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA) é o ensaio AptimaTV (Hologic, San Diego, CA) (VAN DER POL, 2016). O desempenho deste ensaio é excelente, com estimativas de sensibilidade e especificidade de > 90% e > 95%, respectivamente (NYE et al., 2009; SCHWEBKE et al., 2011). O NAAT mais atual é o ensaio GeneXpert TV (Cepheid) que demonstrou sensibilidade e especificidade para tricomoníase de 96,4% e 99,6%, respectivamente. Este é o único ensaio até o momento que foi aprovado pela FDA para uso em urina masculina (GAYDOS et al., 2017).

Os medicamentos recomendados para o tratamento da tricomoníase são metronidazol e tinidazol, ambos pertencentes da família dos 5-nitroimidazóis, escolhidos pela FDA para o tratamento por via oral e parenteral (CDC, 2015). O metronidazol é mais frequentemente utilizado devido ao seu baixo custo associado (SHERRARD et al., 2014).

O metronidazol é um pró-fármaco bioprecursor, trata-se de uma molécula inativa que requer ativação redutiva do grupo nitro para se transformar em seu metabólito ativo (LÖFMARK et al., 2010). Essa ativação ocorre nos hidrogenossomos de *T. vaginalis* e está relacionada à atividade da enzima piruvato ferredoxina oxido-redutase (PFOR). O metronidazol penetra nos hidogrenossomos por difusão passiva e a ativação ocorre quando um elétron é transferido para o grupo nitro, formando um nitro radical tóxico que tem ação no DNA e possivelmente sobre outras biomoléculas vitais (DUNNE et al., 2003; CHUNG, 2005; LÖFMARK et al., 2010). Além disto, ocorre a diminuição da produção de hidrogênio molecular, resultando em um aumento intracelular de peróxido de hidrogênio, que é também um poderoso agente oxidante (DUNNE et al., 2003).

Embora o metronidazol tenha alta eficácia, apresenta vários efeitos colaterais negativos (SECOR, 2012; MIDDLEJ et al., 2019). As reações adversas mais comuns incluem náuseas, vômitos, cefaleias, insônias, tonturas, sonolência, erupção cutânea, boca seca e gosto metálico, sendo os dois últimos associados apenas ao metronidazol oral. Os efeitos secundários mais graves são raros, mas incluem eosinofilia,

leucopenia, palpitações, confusão e neuropatia periférica (CUDMORE et al., 2004; GHOSH et al., 2018).

De maneira preocupante, diversos casos de resistência ao metronidazol vêm sendo documentados. As cepas de *T. vaginalis* resistentes ao metronidazol são prevalentes em 4,3-13,3% dos casos. Além disso, casos de cepas resistentes estão aumentando tanto clinicamente como *in vitro* (SCHWEBKE; BARRIENTES, 2006; KIRKCALDY et al., 2012; SOBEL et al., 2015).

2.5 BIOLOGIA CELULAR

2.5.1 Superfície Celular

A superfície de *T. vaginalis* possui grande interesse para a pesquisa, pois é aí que se encontram as moléculas responsáveis pelo contato e adesão do parasito com a célula hospedeira. Entre as proteínas mais estudadas temos: (a) adesinas; (B) lipofosfoglicanos, que se liga à galectina-1 na célula hospedeira (RYAN et al., 2011) (c) As proteínas BspA símile, que constituem uma enorme família de proteínas de superfície de *T. vaginalis*, (NOËL et al., 2010; LEITSCH, 2016); (d) as tetraspaninas (TvTSPs) que são proteínas envolvidas na adesão celular (DE MIGUEL et al., 2012); (e) metaloproteases (QUAN et al., 2014) e cisteína-proteases (CÁRDENAS-GUERRA et al., 2013) que são proteínas envolvidas na lise das células hospedeiras; (F) as proteínas da membrana TV TVAG_244130 (TvBAP1) e TVAG_188850 (TvBAP2) (MERCER; JOHNSON 2018); dentre outras (tabela 1).

Um estudo proteômico identificou 411 proteínas na membrana de *T. vaginalis* e, destas, 11 foram mais abundantes em cepas aderentes quando comparadas com parasitos menos aderentes. Essas análises demonstraram uma abordagem eficaz para identificar possíveis novos fatores de adesão, bem como outras moléculas de superfície que podem participar no estabelecimento e manutenção da infecção por esse parasito. (DE MIGUEL, et al., 2010). Mais recentemente, demonstrou-se que a superfície de *T. vaginalis* secreta exossomos e libera microvesículas (TWU et al., 2014; NIEVAS et al., 2018), sendo estes importantes moduladores na resposta à célula hospedeira.

A porção citosólica da superfície de *T. vaginalis* está associada a elementos do citoesqueleto compostos por microfilamentos de actina. Estes microfilamentos são de fundamental importância para o processo de interação parasito-hospedeiro e para a transformação ameboide (KUSDIAN et al., 2013; MERCER; JONHSON, 2018).

Tabela 1. Proteínas presentes em *T. vaginalis* e suas respectivas funções

PROTEÍNAS	FUNÇÕES
Adesina Ap23	Citoaderência
Adesina Ap33	Citoaderência e evasão imune do hospedeiro
Adesina Ap51	Citoaderência e evasão imune do hospedeiro
Adesina Ap120	Citoaderência e evasão imune do hospedeiro
Lipofosfoglicanos	Se liga ao receptor galectina-1 na célula hospedeira promovendo a adesão
BspA similar	Poderiam se ligar à matriz das células hospedeiras
Tetraspanina 6	Envolvida na adesão do parasito à célula hospedeira
Metaloproteases	Clivam o alvo da rapamicina em mamíferos da célula hospedeira
Cisteína-protease 30 kDa	Rompimento do citoesqueleto
Cisteína-proteases secretadas 2, 3 e 4	Apoptose e evasão imune do hospedeiro
Legumaina 1	Citoaderência
Enolase 1	Citoaderência
TvBAP1 e TvBAP2	Superexpressão dessas proteínas aumenta a ligação de parasitos transfectados à células epiteliais vaginais

Fonte: A autora.

2.5.2 Hidrogenossomos

Os tricomonadídeos possuem uma organela de origem endossimbiótica relacionada às mitocôndrias que são chamadas de hidrogenossomos (BENCHIMOL, 2004; MÜLLER et al., 2012). O hidrogenossomo é uma organela crucial para *T. vaginalis*, pois produz trifosfato de adenosina (ATP) através de fermentações produtoras de hidrogênio em condições anaeróbicas (MÜLLER et al., 2012). Esta organela tem esse nome devido à capacidade de produzir hidrogênio molecular (LINDMARK; MÜLLER, 1973). Caracteriza-se por ser uma estrutura esférica ou ligeiramente alongada, quando em processo de autoduplicação, apresentando 0,3-0,5 μm de diâmetro, dupla membrana e uma vesícula periférica. Geralmente essa organela fica próxima às estruturas como o axóstilo e a costa (BENCHIMOL, 2008).

Os hidrogenossomos mantêm uma série de características conservadas das mitocôndrias, tanto em nível bioquímico quanto ultraestrutural. Dentre essas, destacam-se: (1) a dupla membrana (BENCHIMOL; DE SOUZA, 1983); (2) o mecanismo de biogênese, que ocorre por segmentação e partição (BENCHIMOL et al., 1996); (3) o sequestro de íons cálcio (RIBEIRO et al., 2001); (4) as enzimas envolvidas na formação de centros de ferro-enxofre (CARLTON, et al., 2007); (5) a cardiolipina, um lipídeo marcador de membrana mitocondrial interna e de bactérias (DE ANDRADE ROSA et al., 2006); (6) a NADH-desidrogenase, uma enzima constituinte da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (CARLTON, et al., 2007).

As principais características bioquímicas dos hidrogenossomos são a produção de hidrogênio molecular, síntese de ATP apenas por fosforilação ao nível de substrato, ausência da cadeia transportadora de elétrons e de material genético (MÜLLER et al., 2012). Ao contrário das mitocôndrias aeróbicas típicas, os hidrogenossomos de tricomonas metabolizam o piruvato usando uma via de 'glicólise estendida', na qual o piruvato é oxidado por piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR) em acetil-coenzima A (acetil-CoA), com a redução concomitante de ferredoxina (STAIRS et al., 2015). A molécula de acetil-CoA é utilizada para a produção de ATP (MÜLLER et al., 2012).

2.5.3 Retículo Endoplasmático

Existem poucos estudos referentes ao retículo endoplasmático (RE) de *T. vaginalis*; a maioria destes trabalhos são de natureza morfológica. O RE é nitidamente visto ao redor do núcleo, formando a membrana externa do envelope nuclear. (BENCHIMOL, 2004). O RE também é encontrado em outros locais do citoplasma, como próximo aos hidrogenossomos, podendo estar relacionado à formação das vesículas periféricas (BENCHIMOL; DE SOUZA, 1985; BENCHIMOL et al., 1996; BENCHIMOL et al., 2000; BENCHIMOL, 2008). Os ribossomos podem ser encontrados associados à membrana do retículo endoplasmático ou distribuídos livremente no citoplasma. (BENCHIMOL, 2004).

2.5.4 Complexo de Golgi e Filamentos Parabasais

Os tricomonadídeos são caracterizados pela presença do aparelho parabasal, formado pelas cisternas do complexo de Golgi e os filamentos parabasais (HONIGBERG et al., 1971; HONIGBERG; BRUGEROLLE, 1990; BENCHIMOL, 2004). O aparelho parabasal fica localizado na região anterior, próximo ao núcleo de *T. vaginalis*. O parasito possui um único complexo de Golgi muito desenvolvido, podendo medir cerca de 5 µm de comprimento, apresentando de 8 a 12 cisternas (BENCHIMOL et al., 2001). Os filamentos parabasais são estruturas cilíndricas e periódicas formadas por bandas claras e escuras, são morfológicamente semelhantes a costa, embora sejam mais delgados (HONIGBERG et al., 1971; LEE et al., 2009).

Estudos mais recentes demonstraram que proteínas relacionadas com a citoaderência e citotoxicidade de *T. vaginalis*, tais como adesinas e cisteino-proteinases, são localizadas no complexo de Golgi, vesículas intracelulares e superfície celular (RIESTRA et al., 2015; SÁNCHEZ-RODRIGUEZ et al., 2018). Os dados sugerem que essas proteínas são processadas no complexo de Golgi antes de serem direcionadas para a superfície do parasito ou secretadas.

2.5.5 Vesículas intracelulares e Lisossomos

O citoplasma das tricomonas possui várias vesículas de tamanhos distintos, que compõem o sistema endocítico da célula. (BENCHIMOL et al., 1990; AFFONSO

et al., 1994). As vesículas podem ser observadas, em sua grande parte, constituindo o processo inicial da endocitose, localizam-se abaixo da superfície celular ou, mais profundamente, no citoplasma (AFFONSO et al., 1997).

Os lisossomos das *Tricomonas* são compartimentos de tamanho variável e demonstram uma reação positiva para a fosfatase ácida (BENCHIMOL et al., 2004). Sugeriu-se que as principais enzimas constituintes dos lisossomos de *tricomonas* são as hidrolases ácidas e neutras (QUEIROZ et al., 1991). Portanto, a acidificação dos lisossomos sugere a presença de uma bomba de prótons nas membranas desta organela, tal como é observado em outros eucariotos.

2.5.6 Vesículas extracelulares

As vesículas extracelulares (VEs) são componentes revestidos de membrana liberadas pelas células para fornecer sinais às células-alvo. Atuam como uma importante fonte de comunicação e sinalização intercelular, a curta ou longa distância, permitindo a troca de proteínas e ácido ribonucleico (RNA) (RAI; JOHNSON, 2019). As VEs podem ser classificadas em: (1) exossomos e (2) microvesículas (MVs), conhecidas também como vesículas tipo “shedding” ou ectossomos. A diferença entre ambos se refere à sua origem, sendo que os exossomos se caracterizam por: (a) apresentar uma origem endossomal; (b) constituir uma população mais homogênea com diâmetro entre 30-120 nm; e (c) serem armazenados em corpos multivesiculares e liberados quando estes se fundem com a membrana plasmática. Em contraste, MVs são usualmente maiores que os exossomos, com diâmetro entre 100 nm a 1 µm, e originam-se por brotamento direto da membrana plasmática (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015; NIEVAS et al., 2018; YAMAMOTO et al., 2019)

T. vaginalis secreta exossomos que possuem grande importância por atuarem na modulação das interações parasito-hospedeiro, assim como na promoção da comunicação parasito-parasito e na colonização das células hospedeiras (TWU et al., 2013). Além dos exossomos, *T. vaginalis* também libera MVs da membrana plasmática que são capazes de interagir com a superfície de outras *tricomonas* e de células hospedeiras. Além disso, os parasitas liberam vesículas grandes que podem interagir com outros parasitos e com a célula do hospedeiro. Os exossomos e as MVs presentes na superfície de *T. vaginalis* são induzidas na presença de células hospedeiras, consistente com um papel na modulação de interações celulares

(NIEVAS et al., 2018). Técnicas proteômicas revelaram que as VEs contêm diversas proteínas envolvidas na citoaderência de *T. vaginalis*. Mais recentemente foi relatado que as VEs de *T. vaginalis* interagem especificamente com o sulfato de heparano dos glicosaminoglicanos encontrados na superfície das células hospedeiras e são internalizadas por estas através de endocitose mediada por caveolina-1 (RAI; JONHNSON, 2019).

2.5.7 Citoesqueleto

Os tricomonadídeos apresentam um citoesqueleto formado por uma variedade de estruturas: o complexo pelta-axóstilo, formados por microtúbulos estáveis que têm função de sustentação (figura 4) (BENCHIMOL, 2005; RIBEIRO et al., 2000; 2002a; 2002b;); os flagelos (HONIGBERG et al., 1971); os corpúsculos basais e seus filamentos associados, de onde emergem os flagelos e as demais estruturas relacionadas ao movimento do parasito (HONIGBERG et al., 1971; RIBEIRO et al., 2000); a costa, filamento proteico e estriado com função de sustentação da membrana ondulante (HONIGBERG et al., 1971); e os filamentos parabasais que proporciona suporte ao Complexo de Golgi (BRUGEROLLE; VISCOGLIOSI, 1994; BENCHIMOL et al., 2001).

O citoesqueleto de *T. vaginalis* também é composto por microfilamentos de actina. Estes microfilamentos são preferencialmente encontrados na região cortical e nos pseudópodes das tricomonas quando realizam fagocitose ou durante a adesão ao substrato ou às células-alvo (PEREIRA-NEVES; BENCHIMOL, 2007).

Foi visto que a transformação ameboide do parasito é acompanhada por uma rápida reorganização dos microfilamentos de actina (KUSDIAN et al, 2013). Os microfilamentos participam deste processo induzindo o rearranjo do citoesqueleto. Há uma regulação positiva da actina e de suas proteínas associadas após o contato com células epiteliais vaginais. Por exemplo, demonstrou-se que a α -actinina e a fimbrina apresentam alteração na sua distribuição durante a transformação ameboide. (KUSDIAN et al. 2013, MERCER; JONHNSON, 2018). Recentemente foi visto que a modulação de proteínas tais como: alfa-actininas, coroninas e fimbrinas também pode estar relacionada à reorganização do citoesqueleto de actina durante a transformação de trofozoítos em pseudocistos (DIAS-LOPES et al, 2018).

Figura 4. Microtúbulos do axóstilo em associação com glicogênio de *Tritrichomonas foetus* visto por microscopia eletrônica de transmissão



Legenda: Axóstilo (A), glicogênio (G). Aumento de 50.000 vezes

Fonte: Benchimol et al., 2000

2.5.8 Núcleo

Os tricomonadídeos apresentam um único núcleo na região anterior da célula quando não estão no processo de divisão. O envoltório nuclear não se fragmenta em nenhuma fase do ciclo celular e, portanto, a mitose é fechada. O núcleo ainda apresenta numerosos complexos de poros distribuídos por todo envoltório, (BENCHIMOL, 2004). Sua porção mais externa está em continuação com o retículo endoplasmático enquanto a membrana interna se encontra voltada para a matriz nuclear (BENCHIMOL et al., 1982; BENCHIMOL, 2004).

2.6 INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

Embora *T. vaginalis* seja reconhecido como um dos mais comuns agentes infecciosos sexualmente transmissíveis em todo o planeta, os processos envolvidos na interação tricomonas-célula hospedeira ainda não foram totalmente esclarecidos. A citoaderência constitui um processo complexo e multifatorial dependente de tempo,

temperatura, pH, íons ferro e que envolve a participação dos fatores de virulência e ambientais (FIGUEROA-ÂNGULO et al., 2012; LUSTIG et al., 2013; LEITSCH, 2016, MERCER; JONHNSON, 2018).

Para que ocorra a infecção, o parasito deve inicialmente degradar e ultrapassar a barreira de muco, e posteriormente, aderir sobre a superfície das células do trato urogenital, assim como sobre as proteínas da matriz extracelular (MEC) (MERCER; JONHNSON, 2018). Logo após a adesão às células alvo, *T. vaginalis* exerce efeitos citotóxicos resultando em citólise, alterações no complexo juncional e ruptura dos tecidos hospedeiros (BENCHIMOL et al., 2015). Após a destruição das células epiteliais, o parasito pode se fixar sobre as proteínas da MEC encontradas na membrana basal, tais como laminina e fibronectina. Durante o processo de infecção, *T. vaginalis* também pode endocitar e fagocitar moléculas e células hospedeiras, bem como bactérias e fungos presentes na microflora vaginal para obter nutrientes e neutralizar os mecanismos de defesa do hospedeiro (MENEZES et al., 2016).

Como *T. vaginalis* é um parasito extracelular, moléculas presentes em sua superfície ou secretadas são consideradas fortes candidatas a desempenharem importantes funções na interação com o hospedeiro. Nesse sentido, o recente sequenciamento do genoma de *T. vaginalis* e o uso de bioinformática estão contribuindo de maneira significativa para refinar nossa compreensão da fisiopatologia do parasito e seus fatores de virulência (HIRT, 2013). Dentro desse contexto, estudos aplicando diferentes abordagens experimentais a nível celular, bioquímico e molecular levaram à identificação de diferentes famílias de proteínas que são consideradas fortes candidatas a fatores de virulência, como adesinas, glicoconjugados, glicosidases, lectinas, receptores para proteínas da MEC, proteínas do citoesqueleto, lipoglicanas, metaloproteases, cisteíno-proteinases (CPs), lipases, proteínas formadoras de poro, dentre outras (MENEZES et al, 2016). A expressão gênica, localização subcelular e atividade enzimática desses fatores de virulência podem ser diferencialmente moduladas por íons ferro, zinco, poliaminas, em resposta ao contato com a célula hospedeira, dentre outros fatores ambientais (FIGUEROA-ÂNGULO et al., 2012; LEITSCH, 2016).

Parte da adesão de *T. vaginalis* às células epiteliais seria mediada por cinco grupos de proteínas (AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23) denominadas adesinas. Estas proteínas são positivamente reguladas por íons ferro e foram identificadas como proteínas multifuncionais que apresentam diferentes funções dependendo da sua

localização subcelular, agindo como enzimas metabólicas em hidrogenossomos e citoplasma ou como adesinas na superfície do parasito (MEZA-CERVANTEZ et al., 2011; MENEZES et al., 2016). Entretanto, o papel das adesinas é um assunto de muita controvérsia entre os estudiosos na área. Um estudo mais recente demonstrou que algumas das enzimas previamente identificadas como adesinas são direcionadas apenas para os hidrogenossomos, não sendo, portanto, reconhecidas como proteínas multifuncionais e com função de citoaderência (RADA et al., 2019).

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima citoplasmática envolvida na via glicolítica responsável pela fosforilação do gliceraldeído-3-fosfato para gerar 1,3-bifosfoglicerato. Ela foi identificada também na superfície de *T. vaginalis* e foi visto que ela é regulada positivamente na síntese e expressão do ferro na superfície. Esta proteína está associada à superfície e se liga à fibronectina, plasminogênio e colágeno, desempenhando papéis importantes no processo de colonização e manutenção no trato urogenital. (LAMA et al., 2009).

As tetraspaninas (TvtSPs), uma classe de proteínas transmembranas, foram identificadas em *T. vaginalis* e reconhecidas como fatores envolvidos na adesão às células hospedeiras e proteínas da MEC. As TvtSPs foram encontradas nos exossomos e microvesículas de *T. vaginalis* (DE MIGUEL et al., 2012; COCERES et al., 2015). Recentemente as TvtSPs foram detectadas em vesículas maiores que 1µm, estas se desprendem da membrana plasmática de *T. vaginalis* (NIEVAS et al., 2018).

O lipofosfoglicano de *T. vaginalis* é um dos componentes mais abundantes do glicocálice que se liga aos receptores galectina-1 e -3 das células hospedeiras (FICHOROVA et al., 2015). O lipofosfoglicano desempenha um papel muito importante na interação parasito-hospedeiro com as células epiteliais vaginais. Foi demonstrado que as células mutantes de *T. vaginalis* que eram deficientes na glicosilação do lipofosfoglicano mostraram adesão e citotoxicidade reduzida às células cervicais humanas. Essa molécula também participa da resposta inflamatória que modula a virulência do parasito (BASTIDA-CORCUERA et al., 2013; MENEZES et al., 2016).

A proteína triosefosfato isomerase (TIM) é uma proteína citoplasmática que participa do metabolismo da glicose em *T. vaginalis*. Estudos demonstraram que, sob condições de cultivo com alta concentração de glicose, a TIM pode ser localizada na superfície de *T. vaginalis*, além do citosol. Na superfície do parasito, a TIM atua como

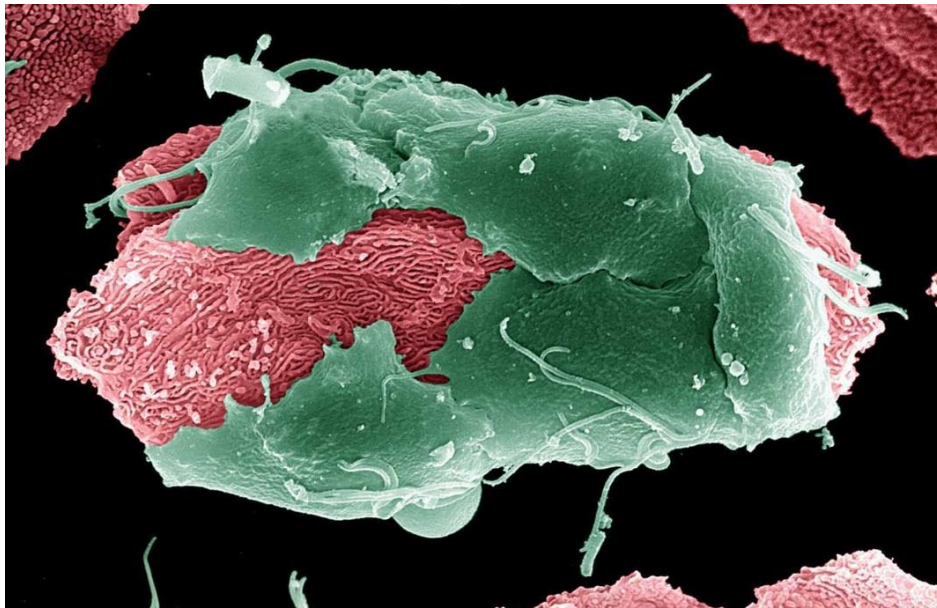
uma proteína de ligação à laminina e fibronectina. Portanto, a TIM poderia desempenhar um papel na aderência do parasito sobre a MEC durante a infecção (MIRANDA-OZUNA et al., 2016; MERCER; JONHSON, 2018).

De maneira similar à TIM, a enolase de *T. vaginalis*, que age primariamente como uma enzima glicolítica, também pode ser encontrada na superfície do parasito, onde atua como um receptor de plasminogênio. Devido a isso, a enolase é considerada atualmente como um novo fator de virulência associado a superfície do parasito (MIRASOL-MELÉNDEZ et al., 2018)

Os mecanismos de ação das proteínas citadas acima na citoaderência de *T. vaginalis* ainda não foram esclarecidos e há muita controvérsia entre os estudiosos da área, visto que a maioria das adesinas de tricomonas são capazes de se ligarem indiscriminadamente a qualquer outra proteína, incluindo superfícies inertes, como plástico e vidro (GARCIA; ALDERETE, 2007; ARDALAN et al., 2009; MERCER; JONHSON, 2018).

Um fato bastante conhecido é que a adesão de *T. vaginalis* sobre as células hospedeiras é seguida pela transformação da morfologia piriforme típica do parasito para uma forma amebóide (KUSDIAN et al., 2013). *T. vaginalis* pode também formar extensos agregados celulares (*clusters*) entre os parasitos ao entrarem em contato com as células hospedeiras (HIRT, 2013). As formas amebóides e os agregados celulares foram positivamente correlacionados com a agressividade do parasito por apresentarem uma maior superfície de adesão e um aumento de expressão de adesinas na superfície celular (HUANG et al., 2012) (figura 5).

Figura 5. Formação de extensos agregados celulares (*clusters*) entorno da célula epitelial vaginal observado por microscopia eletrônica de varredura



Legenda: *Trichomonas vaginalis* (verde) e célula epitelial vaginal (rosa).

Fonte: Pereira-Neves; Benchimol, 2007

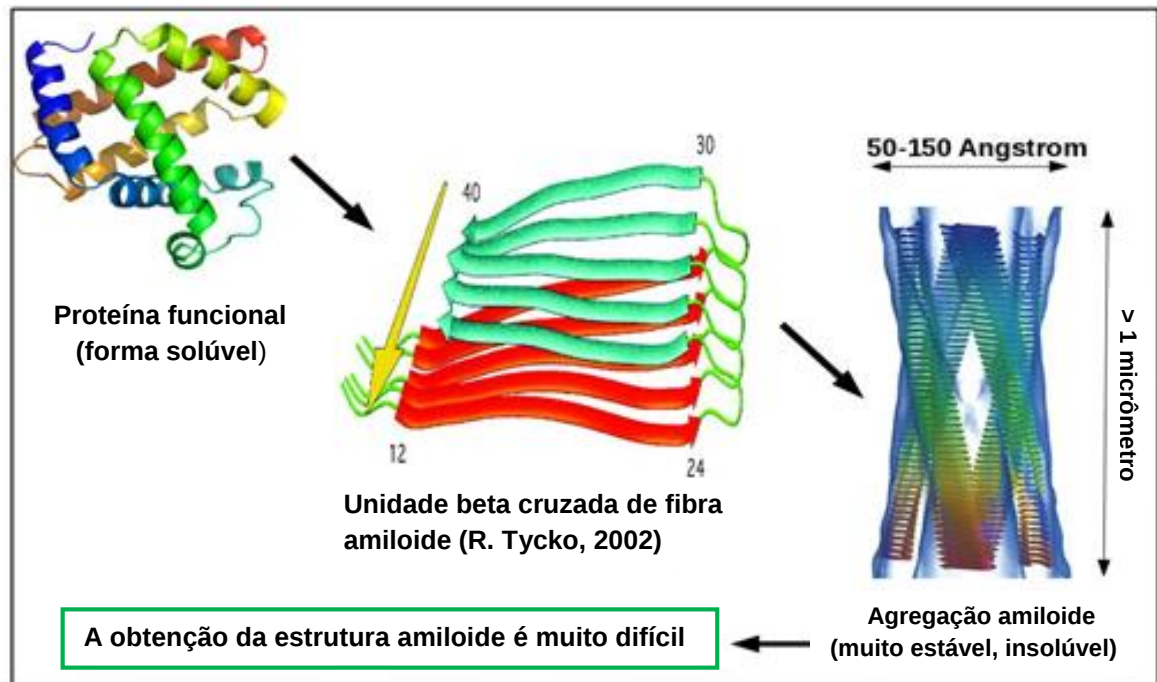
2.7 AMILOIDES

2.7.1 Definição, estrutura e características

O nome “amiloide” foi introduzido em 1854 por Virchow, que os denominou *corporae amilacea* (corpo amiloide). Estes corpos amiloides foram identificados em células do sistema nervoso e receberam essa denominação por apresentarem características semelhantes aos grânulos de amido das células vegetais após a reação de metacromasia do Iodo (SIPE; COHEN, 2000). Em 1859, Friedreich e Kekule demonstraram que os amiloides eram formados principalmente por proteínas (KYLE, 2001). Atualmente, o termo amiloide se refere aos agregados proteicos que se caracterizam por apresentarem uma longa estrutura altamente organizada em fibrilas ricas em fitas beta, empilhadas perpendicularmente ao eixo da fibra (figura 6). As fibras amiloides têm sido relacionadas a importantes distúrbios neurodegenerativos

como, Alzheimer, Parkinson e doença de Huntington, bem como diversas amiloidoses sistêmicas (CHITI; DOBSON, 2017).

Figura 6. Representação esquemática da formação do agregado amiloide



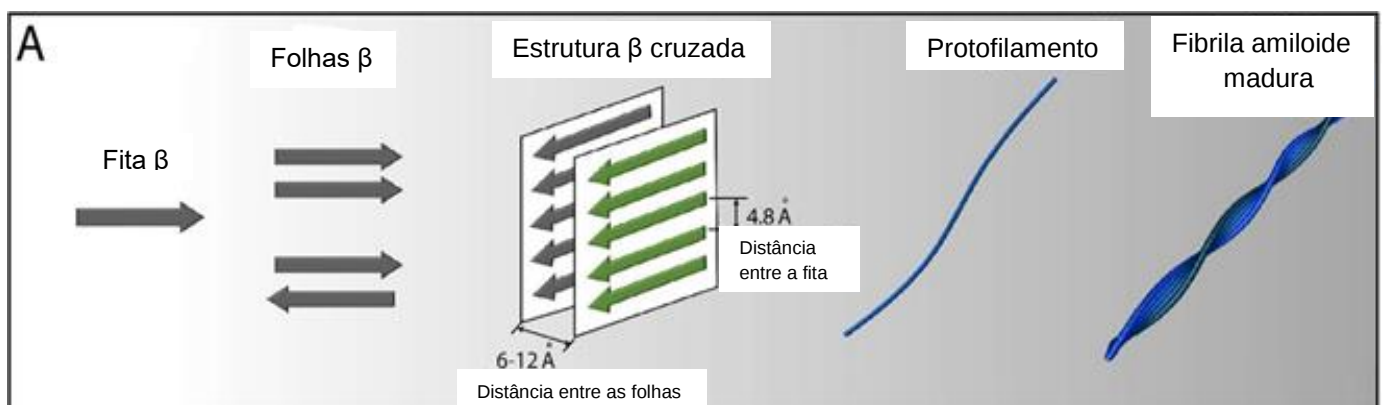
Fonte: Adaptado de Laio; Baftizadeh, 2014

As fibras amiloides podem ser formadas por qualquer tipo de proteína, independentemente da sua sequência primária, função ou estrutura. Além disso, todos os amiloides possuem as mesmas características estruturais, que independem de qualquer propriedade da proteína que tenha lhe dado origem. Inicialmente, uma proteína solúvel se dobra de forma incorreta em um intermediário parcialmente dobrado em fita β . Em seguida os monômeros se associam lentamente para formar um núcleo oligomérico propenso a agregação. Esta fase é considerada como a fase de atraso da agregação e é termodinamicamente desfavorável. A próxima etapa é a fase de alongamento em que proteínas solúveis se desdobram e são adicionadas aos núcleos oligoméricos de agregação, formando as fibrilas. Na fase estacionária a formação de fibrilas está completa e permanece em equilíbrio com as proteínas monoméricas (figuras 6 e 7) (DAS et al., 2018).

Os agregados oligoméricos iniciais formados são bastante instáveis, pois apresentam interações intermoleculares fracas que podem se dissociar para retornar ao estado monomérico solúvel. No entanto, quando o processo de agregação continua a se desencadear, os oligômeros podem sofrer reorganização interna para formar espécies protofibrilares mais estáveis com estruturas de folhas β . Este processo é frequentemente acompanhado pelo aumento do tamanho e compactação das protofibrilas, gerando fibras amiloides maduras (Figura 8) (CREMADES et al., 2012; CHITI; DOBSON, 2017). Os fatores que desencadeiam a formação de amiloides ainda não foram esclarecidos e é assunto de muita controvérsia entre os pesquisadores na área.

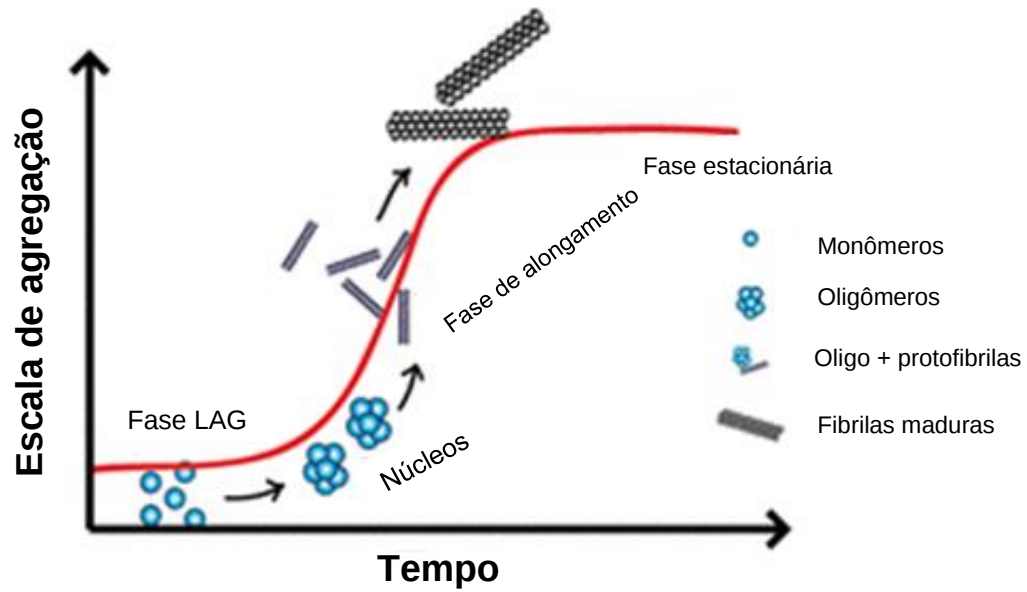
As fibras amiloides possuem uma estrutura de folha β cruzada, na qual as folhas β ficam paralelas ao eixo da fibra com uma distância entre os filamentos de cerca de 4,8 Å e uma distância entre folhas de 6 a 12 Å (CAO; MEZZENGA, 2019) (figura 7). Quando observados por microscopia eletrônica de transmissão ou microscopia de força atômica, as fibras amiloide apresentam de 7 a 13 nm de diâmetro, e seu comprimento pode variar de 50 nm à 10 μ m. O comprimento das fibras amiloides é determinado pelo tipo de proteína nativa que deu origem aos agregados. (WASMER et al., 2008, CHITI; DOBSON, 2017; LEE et al., 2016) (figura 9).

Figura 7. Formação estrutural das fibras amiloides



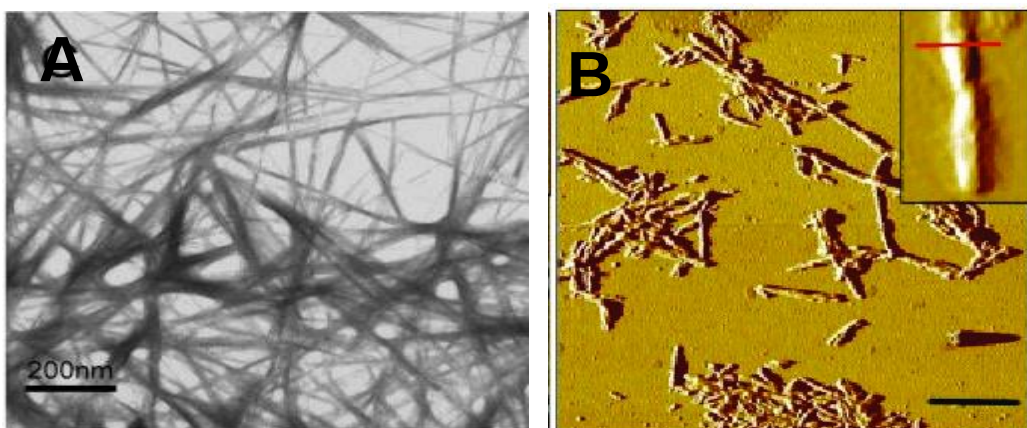
Fonte: Adaptado de CAO; MEZZENGA, 2019

Figura 8. Representação esquemática da formação da fibra amiloide em uma polimerização dependente de nucleação



Fonte: Adaptado de DAS et al., 2018

Figura 9. Fibras amiloides típicas



Legenda: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (A) e microscopia de força atômica (B) de fibras amiloides, barras: 200nm, 1µm

Fonte: FOWLER et al., 2005; BOCHAROVA et al., 2006

A maioria dos amiloides é extremamente estável sob condições fisiológicas e, uma vez formados, permanecem nos tecidos, resistindo à desnaturação (BALBIRNIE et al., 2001; HIROTA-NAKOAKA et al., 2003; CAO; MEZZENGA, 2019). Uma vez formados, os amiloides são insolúveis em dodecil sulfato de sódio (SDS), resistentes ao calor, resistente ao triton e à clivagem proteolítica (ERSKINE et al., 2018). A estabilidade dos amiloides se dá por sua estrutura dupla de folhas β , formando uma coluna com “steric zipper” (EISENBERG; SAWAYA, 2017). O termo “steric zipper” é usado porque as cadeias laterais das fibrilas se interdigitam formando um grande número de ligações de hidrogênio na cadeia principal da fibra, como os dentes de um zíper, excluindo a água do interior do protofilamento. Essa estrutura ordenada confere maior estabilidade para as fibrilas amiloides em comparação com outros tipos de agregados proteicos (CAO; MEZZENGA, 2019).

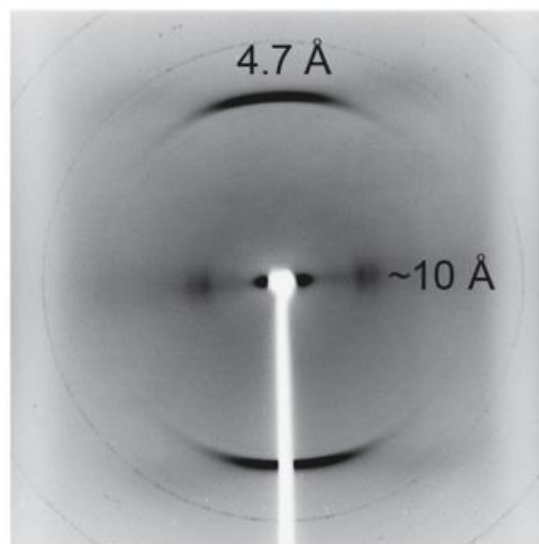
Amiloidose é o nome dado às doenças que resultam no acúmulo de depósitos extra ou intracelular de fibras amiloides. O enovelamento incorreto de proteínas normalmente solúveis causa agregação e deposição nos tecidos, o que rompe a estrutura e as funções normais dos órgãos correspondentes. Existem mais de 30 tipos diferentes de proteínas associado às doenças. As razões que causam o desdobramento da proteína e sua associação com fibrilas amiloides ainda não são conhecidas (PANDE; SRIVASTAVA, 2019). Nas amiloidoses, a citotoxicidade dos amiloides é proveniente dos oligômeros gerados durante o processo de agregação. A presença de vários grupos hidrofóbicos expostos na superfície dos oligômeros é, provavelmente, um dos principais fatores que explicariam a sua citotoxicidade (GUERRERO-MUÑOZ et al., 2015; CHITI; DOBSON, 2017).

2.7.2 Técnicas para identificação de amiloides

A identificação e caracterização dos agregados amiloides pode ser realizada por meio de diversas técnicas complementares. Até o momento, a difração de raios X é o único método considerado “irrefutável” para determinar se uma proteína se encontra no estado de agregação amiloide. A organização estrutural das fibras amiloides faz com que apresentem um padrão de difração de raios-X característico de β -cruzado, com duas reflexões predominantes. Os detalhes característicos são a reflexão meridional de aproximadamente 4,8 Å e a reflexão equatorial da ordem de 10

Å. O espaçamento de 4,8 Å é devido à distância das ligações de hidrogênio entre as pregas de cada folha- β paralela ao eixo longo da fibra. Já a reflexão de cerca de 10 Å representa a distância entre as folhas- β que compõem a fibrila, e pode variar de 5 Å a 14 Å dependendo da composição dos aminoácidos das cadeias laterais (ERSKINE et al, 2018) (figura 10). Contudo, a técnica de difração de raio X possui algumas limitações e desvantagens como por exemplo de somente permitir as análises de proteínas ou agregados proteicos isolados e purificados. Além disso, todo o procedimento possui um alto custo e o equipamento está disponível em poucos centros de pesquisa do país (ERSKINE et al, 2018).

Figura 10. Padrão de difração de raio-x das fibras amiloides



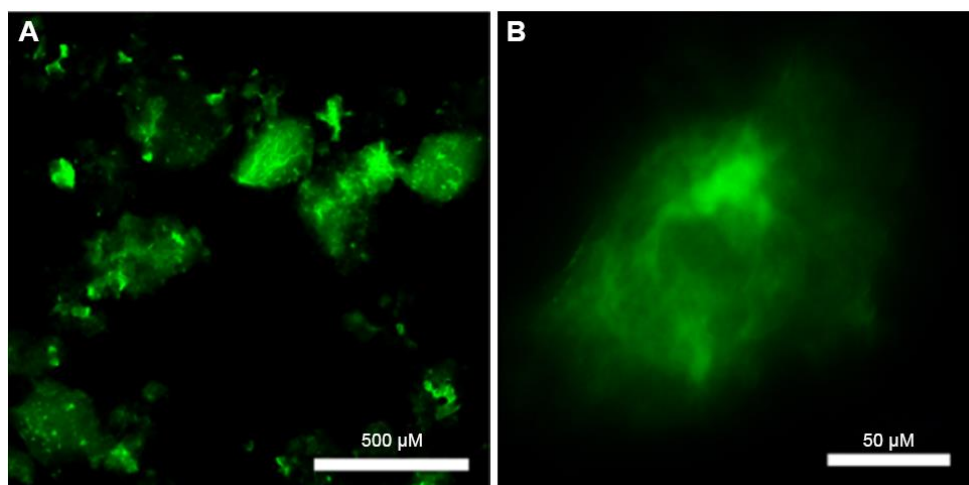
Fonte: CHANNON; MACPHEE; 2008; ERSKINE et al., 2018

Entretanto, a estrutura repetitiva dos amiloides dá origem a uma outra característica que permite que técnicas alternativas sejam utilizadas para identificar esses agregados proteicos em tecidos e células livres: a ligação de corantes específicos como a tioflavina-T (ThT), tioflavina S (ThS), vermelho do Congo e seus derivados. Quando ligado às fibras amiloides estes corantes exibem características diferentes de quando livres em solução (CHITI; DOBSON, 2017). A ThT e ThS emitem uma intensa fluorescência no comprimento de onda > 515 nm (excitação em 450 nm)

na presença de amiloides (VASSAR et al, 1959; ERSKINE et al, 2018) (figura 11). Já o vermelho do Congo é um composto que ao se ligar às fibras amiloides exibe, sob luz polarizada, uma birrefringência verde-esmeralda característica ou dourada devido à sobreposição dos sinais da birrefringência verde (amiloide corado) e vermelha (proteínas não-amiloides coradas) (HOWIE et al., 2009; SIPE et al., 2016; ERSKINE et al., 2018).

Tanto a tioflavina e o vermelho do Congo apresentam algumas limitações, como por exemplo: foi demonstrado que a ThT exibe ligação falso-positiva a outros polímeros, proteínas e agregados de proteínas que não possuem a conformação de amiloide (HUDSON et al., 2009; DE FERRARI et al., 2001; SUGIMOTO et al., 2015). No caso do vermelho do congo, o corante pode se ligar também à celulose, DNA e outras proteínas como o colágeno (ERSKINE et al., 2018).

Figura 11. Nanofibras RADA16-I coradas com tioflavina-T



Legenda: Imagens de microscopia de fluorescência coradas com tioflavina-T para fibras amiloides

Fonte: CHEN et al., 2018

Devido às limitações dos corantes descritos acima, buscou-se métodos ainda mais específicos para identificação de amiloides através de ensaios imunológicos. Foram produzidos anticorpos a partir de fragmentos das fibras amiloides que são capazes de reconhecer epítomos conformacionais comuns a, virtualmente, todas as

fibras amiloides. As regiões que os anticorpos reconhecem são aquelas universalmente encontradas nas fibras amiloides, independente de qual proteína tenha originado o amiloide, tornando estes anticorpos uma importante ferramenta para os estudos de identificação de amiloides em tecidos e células livres (KAYED et al., 2007).

Atualmente, existem anticorpos policlonais anti-amiloides disponíveis comercialmente, tais como o anti-OC e anti-LOC (SIGMA-ALDRICH) (KAYED et al., 2007). Esses anticorpos foram o primeiro método imunológico capaz de diferenciar agregados amorfos de fibras amiloides, uma vez que os agregados amorfos não possuem a região reconhecida pelo anticorpo (KAYED et al., 2007). Contudo, os anticorpos anti-OC e anti-LOC são capazes de reconhecer, além das fibras, os estados oligoméricos que se formam durante o processo de agregação amiloide. Em vista disso, o grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Ronald Wetzel desenvolveu em 2002 dois anticorpos monoclonais anti-fibra amiloide: o anti-W01 e anti-W02. Uma característica importante do anti-W01 e anti-W02 é que são específicos para os protofilamentos e fibras amiloides maduras, não reconhecendo, portanto, os estágios intermediários oligoméricos de agregação amiloide e as proteínas monoméricas solúveis (O'NUALLAIN; WETZEL, 2002; ERSKINE et al., 2018).

Técnicas de bioinformática também são utilizadas para identificação de amiloides *in silico*. Existem várias evidências teóricas e experimentais que indicam que trechos curtos de sequências conhecidas como “*hotspots*” podem ser responsáveis pela formação do amiloide (EMILY et al., 2013). Esses “*hotspots*” são identificados como sequências de seis à doze resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Vários métodos algorítmicos se encontram disponíveis para se prever as regiões da sequência primária das proteínas que são mais propensas à agregação amiloide (HAMODRAKAS, 2011). O AGGRESCAN (<http://bioinf.uab.es/aggrescan/>) é um software que calcula a propensão dos “*hotspots*” nas sequências primárias e analisa simultaneamente uma grande quantidade de sequências primárias. Além disso, o AGGRESCAN também é capaz de antecipar o efeito de alterações genéticas ou substituição de resíduos de aminoácidos nas propriedades de agregação dos polipeptídeos (CONCHILLO-SOLÉ et al., 2007). Já o TANGO (<http://tango.crg.es/>) é um algoritmo estatístico que prevê a agregação de proteínas, baseado nos princípios físico-químicos da formação de fitas beta de peptídeos e proteínas desnaturadas (FERNANDEZ-ESCAMILLA et al., 2004). O metAmyl (<http://metamyl.genouest.org/>) é

um método baseado em estatística que combina métodos existentes conhecidos em um meta-preditor para poder melhorar a previsão dos “hotspots”. (EMILY et al., 2013). O Amylpred (<http://aias.biol.uoa.gr/AMYLPRD/>) é um software de consenso que analisa as sequências proteicas em 11 programas de predição de formação de amiloides. Se pelo menos 5 programas reconhecerem a mesma sequência, o amyldapred indica que está é possivelmente uma região formadora de amiloides (TSOLIS et al., 2013).

2.7.3 Amiloides funcionais

Antigamente, os amiloides eram considerados apenas como agregados associados a patologias, como as doenças neurodegenerativas humanas, mas está cada vez mais claro que a propensão a formar fibrilas amiloides é uma propriedade genérica de virtualmente todas as proteínas, incluindo proteínas alimentares (CAO; MEZZENGA, 2019). Atualmente, acredita-se que os amiloides seriam o estado conformacional mais primitivo no curso da história evolutiva do enovelamento proteico. Isso porque as fibras amiloides possuem capacidade de autorreplicação, atuam como catalisadores biológicos e químicos e apresentam estruturas organizadas com alta estabilidade termodinâmica e energia livre menor que o estado conformacional da proteína nativa que lhe dá origem (GREENWALD; RIEK, 2012).

Existem muitos amiloides que são produzidos pelas células de maneira altamente controlada agindo de forma benéfica para as células, estes são chamados de amiloides funcionais, que podem ser encontrados em uma variedade de organismos, de bactérias à mamíferos (PHAM et al., 2014; JAIN; CHAPMAN, 2019). Algumas hipóteses explicam o porquê alguns amiloides causam doenças e outros são funcionais. São elas: (1) os amiloides associados às doenças são citotóxicos e por isso eles devem estruturalmente diferir dos amiloides funcionais; (2) a agregação dos amiloides funcionais é altamente controlada e por isso evita a citotoxicidade e (3) os amiloides funcionais agregam rapidamente, sendo assim, não consegue acumular oligômeros citotóxicos (OTZEN; RIEK, 2019).

2.7.3.1 Amiloides funcionais em humanos

O primeiro amiloide funcional identificado foi a proteína pré-melanossômica específica das células pigmentares (PMEL) humanas, em 2005. Os amiloides de PMEL estão localizados no lúmen dos melanossomas, uma organela especializada nos melanócitos da pele e olhos, que atua como o local para a síntese do pigmento melanina. As fibrilas de PMEL servem para a deposição do polímero à base de tirosina melanina que age sequestrando intermediários biossintéticos tóxicos na síntese do pigmento (FOWLER et al., 2005; WATT et al., 2013; BISSIG et al., 2016).

Os hormônios peptídicos e proteicos dos grânulos secretores do sistema endócrino, como por exemplo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), prolactina e hormônio do crescimento (GH), são armazenados em um estado de agregação semelhante a amiloide. Os amiloides são responsáveis pela triagem, armazenamento e liberação desses hormônios (MAJI et al., 2009). Acredita-se que a alta densidade das fibrilas amiloides dê aos grânulos secretores do sistema endócrino seu núcleo denso característico (JACKSON; HEWITT, 2017).

Existem estudos também sobre o papel dos amiloides funcionais na reprodução sexual (HEWETSON et al., 2017). Os amiloides estão presentes no acrossomo do espermatozoide. Acredita-se que essas fibrilas facilitariam a liberação controlada de enzimas durante a reação do acrossomo com o oócito, um evento-chave na fertilização (GUYONNET et al., 2014; HEWETSON et al., 2017). Amiloides formados pelas proteínas do subgrupo epididimático de espermatogênese (CRES) estão presentes no epidídimo (WHELLY et al., 2012; WHELLY et al., 2016). Embora o papel dos amiloides formados pelas proteínas CRES não seja bem compreendido, o CRES possui atividade antimicrobiana, é importante para a reação do acrossomo e é necessário para a função lisossômica no epidídimo (WANG et al., 2012; WHELLY et al., 2012; JACKSON; HEWITT, 2017).

2.7.3.2 Amiloides funcionais em bactérias

Os amiloides funcionais mais estudados e melhor caracterizados são os que estão presentes nas bactérias. Os biofilmes de bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas spp* são constituídos por um depósito de fibras amiloides, que são utilizados pelos microrganismos para colonizar

superfícies inertes e mediar ligações a proteínas do hospedeiro (SCHWARTZ; BOLES, 2013; ROMERO; KOLTER, 2014). Essa matriz extracelular fibrilar envolve as células e protege a bactéria proporcionando resistência contra estresses ambientais (JAIN; CHAPMAN, 2019)

Em *Escherichia coli* foi identificado que a proteína “curli” forma amiloides funcionais que atuam como um dos os principais componentes da matriz extracelular envolvidos no processo de adesão da bactéria em superfícies ou hospedeiros (CHAPMAN et al., 2002). Em *Streptomyces* foi visto que os amiloides formados pelas proteínas rodlin participam da formação de hifas aéreas durante a morfogênese de esporos (YANG et al., 2017). Em *Pseudomonas* existem as fibras Fap que foram identificadas no biofilme e que possui propriedade semelhante aos amiloides (DUEHOLM et al., 2010; DUEHOLM et al., 2013). Foi relatado que pili de *Mycobacterium* (MTP), que também contribui para a matriz do biofilme, forma fibras semelhantes a amiloides. (ALTERI et al., 2007; RAMSUGIT et al., 2013; MANN et al., 2016). Estudos em *Streptococcus mutans* identificaram que algumas proteínas de superfície, com o antígeno P1, a proteína precursora WapA e a proteína SMC_63c, formam fibrilas amiloides. Acredita-se que estas fibrilas poderiam ter participação no processo de adesão de *S. mutans* (OLI et al., 2012; BESINGI et al., 2017)

2.7.3.3 Amiloides funcionais em fungos

Vários príons e proteínas semelhantes a príons foram identificados na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CROW; LI, 2011). Esses príons de levedura formam fibras amiloides com morfologia variadas que podem ser transmitidos para células não infectadas (SHEWMAKER et al., 2011; TOYAMA; WEISSMAN, 2011; MADDELEIN et al., 2002; WICKNER et al., 2004; WICKNER et al., 2007).

Em *Candida albicans*, as fibras amiloides são responsáveis pela adesão, agregação célula-célula e substratos (CHAN; LIPKE, 2014). Já é bem estabelecido que determinadas adesinas (Agglutinin-like sequence) presentes na superfície da levedura oportunista *Candida albicans* formam amiloides funcionais que contribuem ativamente para a adesão sobre células e tecidos hospedeiros, bem como para a formação de agregados celulares entre os fungos durante a colonização no hospedeiro (GILCHRIST et al., 2012; GARCIA-SHERMAN et al., 2014).

2.7.3.4 Amiloides funcionais em protozoários

Não existem muitos estudos sobre amiloides funcionais em protozoários. Até o presente momento, os poucos estudos que foram publicados se concentram somente em *Plasmodium falciparum*, o protista causador da Malária. Foi visto que os oligômeros da proteína de superfície 2 (MSP2), que é um componente de revestimento da superfície dos merozoítos, formam interações intermoleculares de cadeia β semelhantes às das fibras amiloides (ADDA et al., 2009). O merozoíto o *Plasmodium falciparum* usa MSP2 para se aderir aos glóbulos vermelhos e iniciar sua internalização (ADDA et al., 2009, JACOB et al., 2016). Mais recentemente demonstrou-se que a MSP2 exerce papel fundamental para a integridade da membrana do protista (LU et al., 2019). Além disso, demonstrou-se que a proteína de superfície 3 do merozoíto (MSP3) também forma estruturas semelhantes a amiloides (IMAM et al., 2013).

2.7.3.5 Importância de estudar amiloides funcionais

Conforme exposto acima, os estudos sobre amiloides funcionais em microrganismos estão ganhando cada vez mais importância devido ao papel desses agregados nas interações célula-célula e como fatores de citoaderência (JAIN; CHAPMAN, 2019). Uma das propriedades genéricas das fibras amiloides é a alta capacidade adesiva devido às suas superfícies carregadas e hidrofóbicas. Esta característica permite a esses agregados ligar-se indiscriminadamente a moléculas pequenas e macromoléculas (CALAMAI et al., 2006), polímeros sintéticos (GHOSH et al., 2014), vírus (MUNCH et al., 2007), bem como sobre a membrana plasmática de células (JACOB et al., 2016) e a parede celular de microrganismos (GILCHRIST et al., 2012; SCHWARTZ; BOLES, 2013). Foi demonstrado que as fibrilas amiloides podem mimetizar a MEC, agindo como ligantes que permitem o crescimento e adesão celular em culturas *in vitro* (JACOB et al., 2018; JACOB et al., 2019).

Entretanto, não existem estudos na literatura referentes a amiloides funcionais em *T. vaginalis*. Nossa hipótese é que, assim como outros microrganismos, *T. vaginalis* produziria amiloides funcionais e estes participariam efetivamente no processo de interação parasito-hospedeiro. Dentro desse contexto, a compreensão dos mecanismos exatos da citoaderência de *T. vaginalis* é de fundamental

importância, pois o sucesso do parasito em colonizar e estabelecer a infecção em humanos depende da habilidade das tricomonas de aderir sobre as células hospedeiras. Portanto, informações pertinentes ao processo de adesão e de citotoxicidade de *T. vaginalis* contribuirão de maneira altamente significativa para desvendar as estratégias de sobrevivência do parasito, para descoberta de alvos terapêuticos promissores e para o desenvolvimento de tratamentos alternativos para a prevenção e controle da infecção.

3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A AMILOIDES FUNCIONAIS EM *Trichomonas vaginalis*

Tuanne dos Santos Melo¹, Yesica Romina Nievas², Natália de Miguel², Fernando Lucas Palhano Soares³, Débora Foguel³, Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo¹, Antonio Pereira-Neves^{1*}

¹ Laboratório de Biologia Celular de Patógenos, Depto. Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz Pernambuco, Recife, PE, Brasil

² IIB-INTECH, CONICET-UNSAM, Chascomús, Buenos Aires, Argentina

³ Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

* Autor correspondente: Laboratório de Biologia Celular de Patógenos, Depto. Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz Pernambuco. Avenida Professor Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária – Recife – Pernambuco – Brasil. E-mail: antoniopnn@yahoo.com.br

RESUMO

Trichomonas vaginalis, causador da tricomoníase humana, é um parasito extracelular que pode alterar sua morfologia e formar clusters após contato com células-alvo. Estas transformações são relacionadas à patogenicidade devido ao aumento da expressão de proteínas associadas à citoaderência. Entretanto, os mecanismos que envolvem este processo são pouco compreendidos. Amiloides são agregados proteicos em folhas- β , associados a doenças como Alzheimer e Parkinson. No entanto, existem amiloides funcionais que são produzidos para desempenhar funções biológicas importantes, tais como adesão, migração e sinalização, processos esses que *T. vaginalis* usa para colonizar o hospedeiro. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi identificar a presença de estruturas semelhantes a amiloides funcionais em *T. vaginalis* com ênfase nas suas possíveis participações nos mecanismos de citoaderência e formação de *clusters*. Análises morfológicas com marcadores específicos de amiloides revelaram a presença de estruturas semelhantes aos amiloides na superfície celular, hidrogenossomos, complexo de Golgi,

corpos multivesiculares e vesículas extracelulares de *T. vaginalis*. Além disto, observamos um aumento de marcação para amiloides em *T. vaginalis* na morfologia ameboide, *clusters* celulares e após interação com leveduras e células hospedeiras. Análises *in silico* demonstraram que proteínas envolvidas na citoaderência tais como as adesinas e tetraspaninas possuem alto potencial amiloidogênico. Resíduos de aminoácidos amiloidogênicos da tetraspanina 8 poderiam estar envolvidos na formação de *clusters* em *T. vaginalis*. Os dados de bioinformática foram relacionados com os estudos morfológicos. Até o momento, este é o primeiro relato de presença de estruturas semelhantes aos amiloides em *T. vaginalis*.

Palavras-chave: Agregação. Amiloides funcionais. Interação parasito-hospedeiro. Tricomoníase. *Trichomonas vaginalis*.

1. INTRODUÇÃO:

O protista *Trichomonas vaginalis* é o agente etiológico da tricomoníase, infecção sexualmente transmissível (IST) que afeta mais de 156 milhões de pessoas no planeta (1). Esta doença se caracteriza por um processo infeccioso no trato urogenital, sendo mais frequente em mulheres. Uma inflamação severa e irritante, resultante de exacerbada leucorreia vaginal, é o principal sintoma (2). Nos homens, *T. vaginalis* geralmente é assintomática, mas esporadicamente pode causar uretrite, prostatite e infertilidade (3, 4). A infecção está também associada a danos mais agressivos como: ruptura das membranas placentárias, parto prematuro, infertilidade (5), complicações adversas em recém-nascidos (6), aumento do risco de aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV) predisposição ao câncer cervical e um tipo agressivo de câncer de próstata (7, 5).

À parte do seu interesse médico, *T. vaginalis* também é importante sob o aspecto de biologia celular. Neste organismo ocorre a presença dos hidrogenossomos, organelas de origem endossimbiótica relacionada às mitocôndrias e produtoras de ATP e de hidrogênio molecular, de um complexo de Golgi muito desenvolvido, do complexo pelta-axostilar (uma estrutura estável, composta por microtúbulos), da costa (estrutura proteica estriada) e de uma variedade de estruturas proteicas cujas funções ainda são desconhecidas (8).

Apesar de *T. vaginalis* ser um agente infeccioso muito disseminado, os mecanismos envolvidos na interação parasito-hospedeiro ainda não foram totalmente esclarecidos. Sabe-se que a citoaderência é um pré-requisito para o estabelecimento e manutenção de *T. vaginalis* no trato urogenital humano (5). Parte da adesão de *T. vaginalis* às células epiteliais é mediada por cinco proteínas (AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23) denominadas adesinas. Essas adesinas são positivamente reguladas por íons ferro e identificadas como proteínas multifuncionais, agindo como enzimas metabólicas nos hidrogenossomos e como adesinas na superfície do parasito (9, 4). Recentemente, tetraspaninas (TvTSPs), uma classe de proteínas transmembranas, foram identificadas em *T. vaginalis* e reconhecidas como fatores envolvidos na adesão às células hospedeiras e proteínas da MEC (10). TvTSPs e adesinas foram encontradas em vesículas extracelulares (VEs) liberadas por *T. vaginalis* e o conteúdo dessas vesículas poderia aumentar potencialmente a adesão do parasita sobre as células epiteliais hospedeiras (11, 12). Contudo, o papel dessas proteínas na citoaderência de *T. vaginalis* ainda não foi esclarecido e há muita controvérsia entre os estudiosos na área, visto que a maioria das adesinas de tricomonas são capazes de se ligar indiscriminadamente a qualquer outra proteína, incluindo superfícies inertes, como plástico e vidro (13, 14)

Um fato bastante conhecido é a transformação morfológica sofrida pelo parasito, minutos após a adesão às células do hospedeiro. Estes organismos, que apresentam um corpo celular piriforme quando estão se locomovendo livremente, assumem uma morfologia ameboide ao interagirem com suas células-alvo (15). Além da transformação ameboide, *T. vaginalis* pode também formar extensos agregados (*clusters*) celulares entre os parasitos (16). As formas ameboides e os agregados celulares foram positivamente correlacionados com a patogenicidade de *T. vaginalis* por apresentarem maior superfície de adesão e um aumento de expressão de proteínas envolvidas na citoaderência (15).

Amiloides são agregados proteicos caracterizados por uma estrutura organizada em fibrilas ricas em fitas-beta (17, 18) As fibras amiloides têm sido relacionadas a doenças humanas como, Alzheimer e Parkinson (17). No entanto, existem amiloides que são formados de maneira altamente controlada e exercem funções biológicas importantes para os organismos. Estes são denominados amiloides funcionais descritos em diversos grupos taxonômicos, de bactérias a humanos (19, 20). Por exemplo, bactérias e leveduras produzem amiloides que contribuem para a adesão

aos substratos ou células hospedeiras (21, 22). Em mamíferos, descobriu-se que amiloides exercem papel funcional para a síntese de melanina e armazenamento de hormônios da tireoide (23).

Uma propriedade genérica das fibras amiloides é sua alta capacidade de se ligar indiscriminadamente a moléculas pequenas, macromoléculas (24), polímeros sintéticos (25), vírus (26), membrana plasmática (22) e parede celular de microrganismos (21, 27). Por exemplo, biofilmes de bactérias, e.g. *Escherichia coli*, e fungos, e.g. *Candida spp*, são constituídos por um depósito de amiloides, utilizados para colonizar substratos e mediar ligações com proteínas do hospedeiro (27, 28). Sabe-se que adesinas de *Candida albicans* formam amiloides funcionais que contribuem para adesão e colonização sobre células hospedeiras (29). Foi descrito que uma proteína encontrada na superfície do merozoíto de *Plasmodium falciparum*, causador da Malária, se estrutura em amiloides os quais auxiliam na adesão do parasito nas hemácias (30, 22).

Portanto, os amiloides funcionais estão envolvidos em vários processos biológicos como adesão, migração, sinalização e motilidade, processos esses que *T. vaginalis* usa para colonizar o hospedeiro. Entretanto, não há estudos referentes a amiloides em *T. vaginalis*. O objetivo desse trabalho foi identificar a presença de estruturas semelhantes a amiloides funcionais em *T. vaginalis* com ênfase nas suas possíveis participações nos mecanismos de citoaderência e formação de agregados celulares. Através de análises morfológicas e funcionais, utilizando marcadores específicos para fibras amiloides, encontramos marcação positiva para estruturas semelhantes aos amiloides na superfície celular, hidrogenossomos, complexo de Golgi, corpos multivesiculares e VEs de *T. vaginalis*. Além disto, observamos um aumento de marcação para amiloides em *T. vaginalis* na morfologia ameboide, nos clusters de parasitos e após interação com leveduras e células hospedeiras. Análises *in silico* demonstraram que algumas proteínas envolvidas na citoaderência apresentam alto potencial para formar amiloides, dentre estas a TvTSP8 que participa da formação dos clusters de parasitos. Até o momento, este é o primeiro relato de presença de estruturas semelhantes a amiloides em *T. vaginalis*.

2. METODOLOGIA

2.1 CULTIVO *in vitro* DE *T. vaginalis*

Parasitos de duas cepas foram utilizados neste estudo: (a) cepa Jt, menos citoaderente, isolada no Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio de Janeiro e mantida em cultura desde 1980; (b) cepa FMV1, mais citoaderente, um isolado do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina de Valência (Rio de Janeiro) obtido em 2004 de uma paciente assintomática, (31). Os parasitos foram cultivados axenicamente em fase de crescimento logarítmica em tubos de plástico falcon de 15ml contendo meio TYM (triptose-levedura-maltose) (32), acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (60°C por 30 minutos) e antibióticos. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com passagens a cada 48 horas. O meio TYM apresenta a seguinte composição: 22 mg/ml de triptose (BBL), 11 mg/ml de extrato de levedura (BBL), 5,6 mg/ml de maltose (Sigma Chemical Co.), 1 mg/ml de L-cisteína (Sigma Chemical Co.), 0,2 mg/ml de ácido ascórbico (Sigma Chemical Co.), 0,9 mg/ml de fosfato de potássio monobásico (Vetec) e 0,9 mg/ml de fosfato de potássio dibásico (Vetec) e água Milli-Q. O meio de cultura foi autoclavado a 120°C por 20 minutos.

2.2 ENSAIOS DE MARCAÇÃO PARA AMILOIDE COM TIOFLAVINA-S (ThS)

Parasitos cultivados por 48 horas a 37°C foram fixados com 4% de paraformaldeído em 0,1 M tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) por 1 hora a temperatura ambiente e, em seguida, estocados a 4°C *overnight*. Após este período os parasitos foram lavados três vezes por centrifugação em salina tamponada (PBS), pH 7,2. As amostras foram divididas em dois grupos: (1) não permeabilizadas e (2) permeabilizadas com Triton X-100 por dez minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, os parasitos foram lavados três vezes com PBS. Os parasitos foram incubados em condições diferentes da solução de ThS. Para FMV1, os parasitos foram submetidos à incubação com uma solução de ThS à 0,05% ou 0,5% em 50% de etanol por 10 ou 45 minutos, respectivamente, no escuro. Para cepa Jt a incubação foi feita apenas com a concentração de TioflavinaS de 0,5%.

As amostras foram então lavadas cinco vezes em etanol 70% e duas vezes em PBS. Os parasitos foram aderidos em lamínulas previamente recobertas com poli-L-lisina (0,1% em PBS pH 7,2) (Sigma ChemicalCo.) e, em seguida, incubados com o marcador Hoechst 33342 (10 µg/ml) (SigmaChemical Co.) por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro. Posteriormente, as lâminas foram montadas com o líquido anti-decaimento *Prolong Gold* (Life Technologies). As amostras foram observadas usando um microscópio óptico de fluorescência (Leica DMI8) com os seguintes filtros (1) Dapi excitação $\lambda=325-375\text{nm}$ e emissão de $\lambda=435-485$; (2) FITC excitação $\lambda= 460-500$ e emissão $\lambda= 512-542$. As imagens foram adquiridas com uma câmera digital de alta resolução LEICA DFC7000GT e, posteriormente, processadas no programa Adobe Photoshop CS6 13.1.

2.3 ENSAIOS DE MARCAÇÃO PARA AMILOIDE COM VERMELHO DO CONGO

Parasitos foram coletados por centrifugação, fixados, lavados três vezes por centrifugação em PBS (pH 7,2) e aderidos em lamínulas previamente recobertas com poli-L-lisina (0,1% em PBS pH 7,2) (Sigma ChemicalCo.) Em seguida, os parasitos foram incubados com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) (3% peso/volume) em 80% de etanol e 0.01% de hidróxido de sódio (NaOH), por 20 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, para detectar a presença de amiloides em *T. vaginalis*, as amostras foram incubadas com 0.2% de vermelho do Congo em solução saturada de NaCl (3% peso/volume) em 80% de etanol e 0.01% de NaOH por 60 minutos, a temperatura ambiente no escuro. Adicionalmente, algumas amostras foram permeabilizadas conforme descrito no item 2.2, antes de serem incubadas com as soluções saturadas de NaCl e vermelho do Congo. As amostras foram, então, desidratadas com a solução de álcool alcalino (15 banhos) e lavadas dez vezes em água destilada. Em seguida as amostras foram incubadas com o marcador Hoechst 33342 (10 µg/ml) (SigmaChemical Co.) por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro. As lâminas foram montadas e as imagens foram adquiridas e processadas como mencionado no item 2.2

2.4 ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Primeiramente foram utilizadas as fibras amiloides da proteína α – sinucleína como controle positivo utilizando o método como descrito em (38). Os parasitos da cepa FMV1 foram cultivados, fixados e lavados como descrito no item 2.2. Em seguida, as células foram aderidas em lamínulas previamente recobertas com poli-L-lisina (0,1%). As amostras foram permeabilizadas como descrita no item 2.2. Posteriormente, os parasitos foram lavados três vezes em PBS pH 8,0, bloqueados com 50 μ M cloreto de amônio em PBS, pH 8,0, por 30 minutos e com 3% PBS/BSA pH 8,0 por 15 minutos. Os parasitos foram incubados com os seguintes anticorpos que reconhecem epítomos comumente encontrados em várias fibras amiloides: (1) anticorpo policlonal anti-LOC (SIGMA ALDRICH) na diluição de 1/100 em 3% PBS/BSA; (2) anticorpos monoclonais anti-W01 e anti-W02 (cedidos gentilmente pelo Dr. Ronald Wetzel) na diluição de 1/500 em 3% PBS/BSA. Adicionalmente, alguns parasitos foram tratados com 1% de SDS e 0,05% de triton X-100 por cinco minutos sob leve agitação. Em alguns ensaios, os parasitos foram também incubados com os anticorpos que reconhecem as enzimas hidrogenossomais: (1) anticorpo monoclonal anti-piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR) na diluição de 1/300 em 3% PBS/BSA (2) anticorpo monoclonal anti-enzima málica (cedidos gentilmente pelo Dr. Jan Tachezy) na diluição de 1/300 em 3% PBS/BSA. Os anticorpos foram incubados em câmara úmida overnight na geladeira. Em seguida, as lamínulas foram lavadas em PBS pH 8,0 e bloqueadas como citado acima. As células foram incubadas com: (1) anticorpo secundário anti-coelho IgG 488 para o anti-LOC; o anti-mouse IgM 546 para o anti-WO1 e anti-WO2 e; o anti-mouse IgG 546 para anti-PFOR e anti-enzima málica por 40 minutos em temperatura ambiente no escuro. Para a marcação do núcleo foi utilizado o Hoescht 33342 (10 μ g/ml) (SigmaChemical Co.) por 15 minutos a temperatura ambiente. Adicionalmente, em alguns ensaios, parasitos foram lavados em PBS pH 8,0 e incubados com uma solução de 0,5% de tioflavina S em etanol 50% por uma hora em temperatura ambiente. As células foram lavadas cinco vezes em etanol 70% e duas vezes em PBS pH 8,0. As lâminas foram montadas e as imagens foram adquiridas e processadas como mencionado no item 2.2, com a adição do filtro RHOD excitação λ =541-551 e emissão λ = 565-605.

2.5 IMUNOCITOQUÍMICA/ULTRAESTRUTURAL

2.5.1 Resina unicryl

As células foram fixadas em 4% de PFA, 0,5% de glutaraldeído, 0,1M de tampão cacodilato de sódio, 1% de ácido pícrico, 5mM cloreto de cálcio e 0,5% sacarose por uma hora em temperatura ambiente. Após a fixação os parasitos foram lavados três vezes em PBS pH 8,0 e incubados com 50mM de cloreto de amônio em PBS, pH 8,0 por 30 minutos. As amostras foram desidratadas em concentrações crescente de etanol por 8 horas e infiltradas em concentrações crescentes de resina unicryl (EMS) por 10 dias. O material foi polimerizado sob luz ultravioleta (UV) à -20°C por 72h, cortado no ultramicrotomo e coletados em grade de níquel. As grades foram bloqueadas com 50µM cloreto de amônio em PBS pH 8,0 por 30 minutos, 3% PBS/BSA pH 8,0 por 15 minutos e 0,2% Tween em PBS por 10 minutos. Em seguida, foram incubadas com os anticorpos anti- LOC, anti-W01 e anti-W02 nas condições mencionadas no item 2.5. Posteriormente, as amostras foram bloqueadas com 3%PBS/BSA e incubadas com anticorpos conjugados com ouro coloidal 10nm (BBI, EUA) no escuro à temperatura ambiente por uma hora. As grades foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados no microscópio eletrônico de transmissão (MET) (FEI Tecnay G2 Spirit Biotwin). As imagens foram adquiridas com um sistema de câmera CCD (MegaView 2K)

2.5.2 Contrastação negativa

As amostras das vesículas foram obtidas conforme descrito anteriormente em nosso trabalho (12). As amostras foram fixadas conforme o item 2.5.1 com exceção da presença de cloreto de cálcio e sacarose. As vesículas isoladas foram bloqueadas e marcadas em suspensão com os anticorpos anti-amiloide, conforme descrito no item 2.5.1. Em seguida, as amostras foram depositadas em grades de níquel revestidas com carbono e contrastadas negativamente com 1% de acetato de uranila. As imagens foram observadas e adquiridas como descrito no item 2.5.1.

2.6 ENSAIOS DE INTERAÇÃO PARASITO-LEVEDURA

Para esse ensaio foi utilizado o *Saccharomyces cerevisiae* obtido do fermento biológico seco instantâneo da marca Fleishmann. Inicialmente as leveduras foram

colocadas em um erlenmeyer com soro fetal bovino à 37°C em banho maria. Posteriormente, foi realizado o acompanhamento do processo de brotamento das leveduras através de microscopia óptica. Em seguida as leveduras foram incubadas com as tricomonas na proporção de 10:1 (leveduras:tricomonas) por 30 minutos a 37°C em meio TYM e soro fetal bovino. A interação foi monitorada utilizando um microscópio óptico invertido. Em seguida, os parasitos foram lavados três vezes por centrifugação em PBS (pH 7,2) e fixados com 4% de paraformaldeído em 0,1 M tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) por uma hora a temperatura ambiente e em seguida guardado a 4°C *overnight*. Os parasitos foram lavados em PBS pH 8,0 e incubados com uma solução de 0,5% de tioflavina S em etanol 50% por 45 minutos em temperatura ambiente. Os parasitos foram processados e visualizados como descrito no item 2.2

2.7 ENSAIOS DE INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

As células do epitélio vaginal (CEV), obtidas por swab de uma doadora saudável, foram utilizadas como célula hospedeira nos ensaios de interação. As CEVs foram lavadas e centrifugadas e posteriormente foram incubadas com os parasitos nas proporções de 5:1 e 1:1 (CEV-Tricomonas) por 30 minutos à 37°C em PBS. A interação foi monitorada utilizando um microscópio óptico invertido. Em seguida as células foram lavadas três vezes por centrifugação em PBS (pH 7,2) e fixadas conforme descrito no item 2.2. Os parasitos foram lavados em PBS pH 8,0 e incubados com uma solução de 0,5% de tioflavina S em etanol 50% por uma hora em temperatura ambiente. Os parasitos foram processados e visualizados como descrito no item 2.2.

2.8 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS PROTEICAS DE *T. vaginalis*

As sequências primárias de 626 proteínas conhecida encontradas na superfície de *T. vaginalis* (33) foram adquiridas em <http://trichdb.org/trichdb/> e analisadas em dois algoritmos especificamente construídos para calcular a propensão das proteínas em sofrer agregação amiloide: (a) TANGO (<http://tango.crg.es/>); e (b) AGGRESCAN (34). As análises foram realizadas utilizando os parâmetros e condições padrões de cada algoritmo. Após as análises, as proteínas foram

ranqueadas por um parâmetro onde valores positivos sugerem uma propensão geral de alta agregação amiloide, enquanto valores negativos sugerem uma propensão geral de baixa agregação amiloide.

2.9 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS E EXPRESSÃO EXÓGENA DE PROTEÍNAS EM *T. vaginalis*

Os genes de tetraspanina 8 (TvTSP8) selvagem e mutante (v135E) foram clonados e expressos em *T. vaginalis* utilizando vetor de α -SCS-NEO (α -succinil coenzima A sintetase - Neomicina fosfotransferase). A clonagem dos vetores e a transfecção foram realizados exatamente como descrito em (11).

2.10 CONTAGEM DE CLUSTERS DO PARASITO

Os parasitos expressando as proteínas transfectadas de TVTSP8 foram contados por campo no microscópio óptico de contraste de fase na objetiva de 10X, como descrito por (11).

3. RESULTADOS

3.1 A SUPERFÍCIE CELULAR E OS HIDROGENOSSOMOS DE *T. vaginalis* SÃO MARCADOS POR TIOFLAVINA S (ThS)

Inicialmente, para detectar a presença de amiloides em *T. vaginalis*, foram realizados ensaios com o marcador ThS, utilizando parasitos obtidos de cultura axênica. ThS é um marcador clássico para amiloides que emite uma intensa fluorescência no comprimento de onda > 515 nm (excitação em 450 nm) na presença das fibras (35, 36). Utilizamos primeiramente parasitos não permeabilizados da cepa FMV1 (mais citoaderente) na concentração de 0,05% ThS. Os resultados mostraram uma intensa marcação na superfície celular e em estruturas esféricas distribuídas ao longo do parasito, que poderiam corresponder aos hidrogenossomos (figura 1 a-b). Sabe-se que amiloides são resistentes a detergentes como por exemplo o triton X-100 (36). Portanto, ensaios com parasitos permeabilizados com triton foram também realizados. O mesmo padrão de marcação na superfície celular e nas estruturas

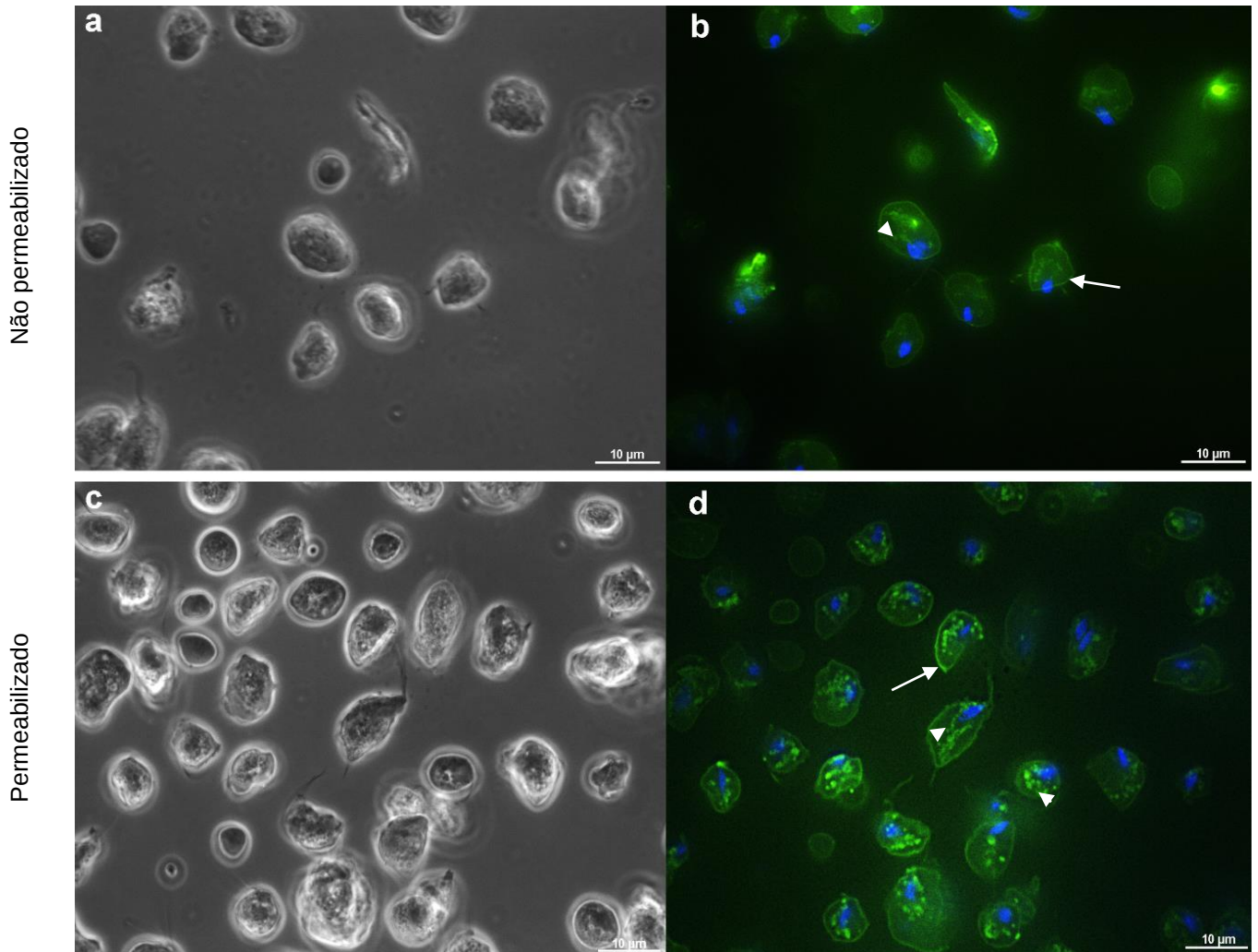
citossólicas pontuais foi encontrado (fig. 1 c-d), sugerindo assim a presença de estruturas semelhantes a amiloides em *T. vaginalis*.

Interessantemente, quando os ensaios foram realizados com parasitos da cepa menos citoaderente Jt, não observamos marcação para 0,05% ThS (dado não mostrado). Foram realizados ensaios com diferentes concentrações de ThS e marcação positiva, similar à cepa FMV1, na superfície celular e nas estruturas citossólicas foi observada a partir da concentração de 0,5% (Figura 2). Portanto, os resultados demonstram que a sensibilidade de marcação de ThS é maior na cepa mais citoaderente.

Para confirmar se as estruturas pontuais citossólicas marcadas com ThS seriam os hidrogenossomos, realizamos experimentos de dupla marcação utilizando anticorpos anti-proteínas hidrogenossomais: anti-piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR) e anti-enzima málica (37). Os resultados mostram claramente colocalização da marcação de ThS e anti-PFOR em todas as células (figura 3). No entanto, quando o anticorpo anti-enzima málica foi utilizado, observamos uma sobreposição parcial da marcação. (figura 4). Portanto, os resultados indicam que as estruturas citossólicas marcadas com Ths dentro do parasito correspondem aos hidrogenossomos.

Nós também realizamos ensaios com o marcador vermelho do Congo (VC), um composto que ao se ligar às fibras amiloides exibe, sob luz polarizada, uma birrefringência verde-esmeralda característica ou dourada. Entretanto, não obtivemos resultados positivos com ambas as cepas de *T. vaginalis* (dados não mostrados).

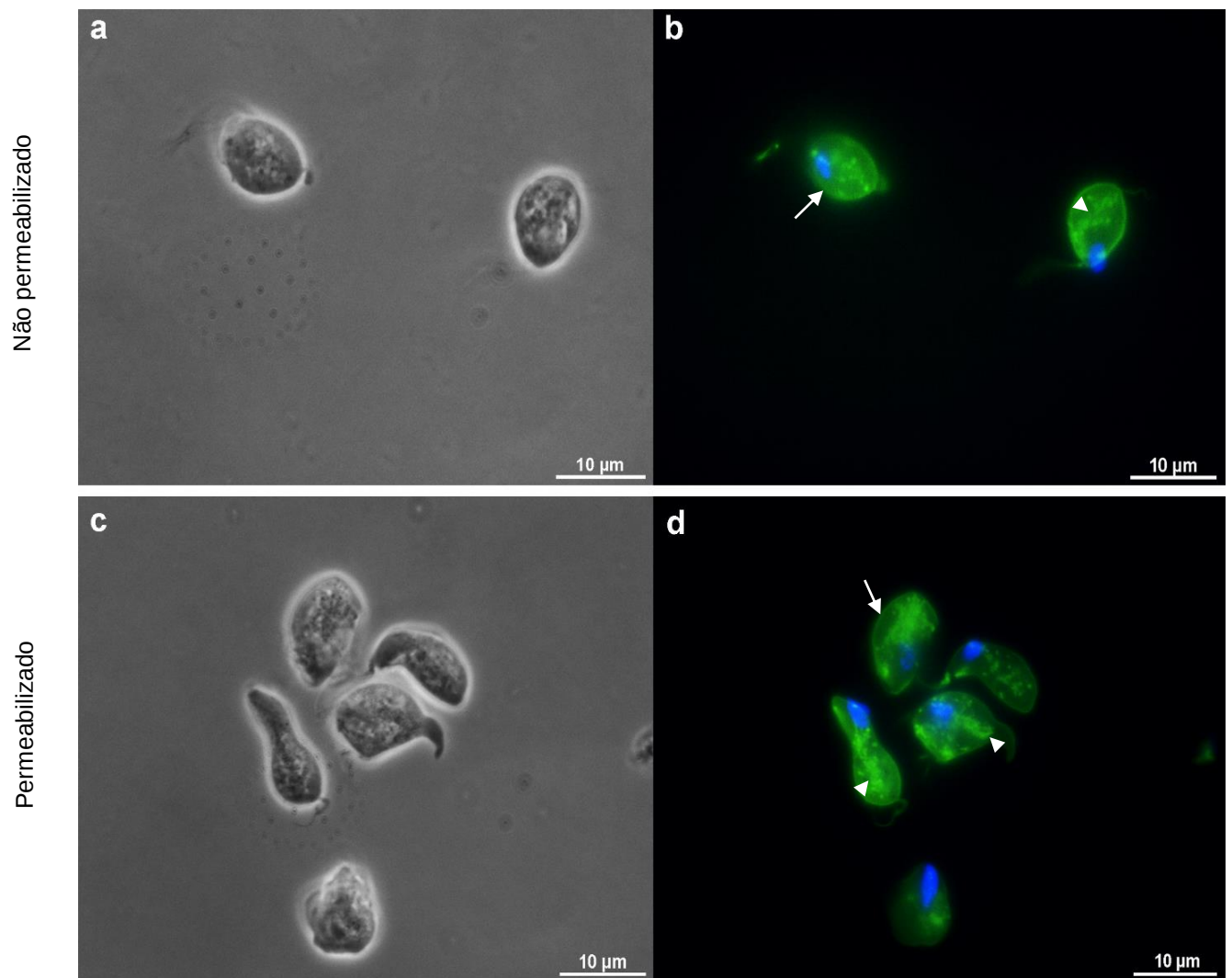
Figura 1. Cepa FMV1 de *T. vaginalis* não permeabilizada e permeabilizada marcada com ThS



Legenda: *T. vaginalis* observada por contraste de fase (**a, c**) e por fluorescência (**b, d**). Observa-se marcação de ThS na superfície celular (setas) e em estruturas esféricas no interior do parasito (cabeças de seta) (**a-d**). Os núcleos (azul) foram marcados com Hoescht. (a-b) não permeabilizado e (c-d) permeabilizado. Barras= 10 μm

Fonte: A autora

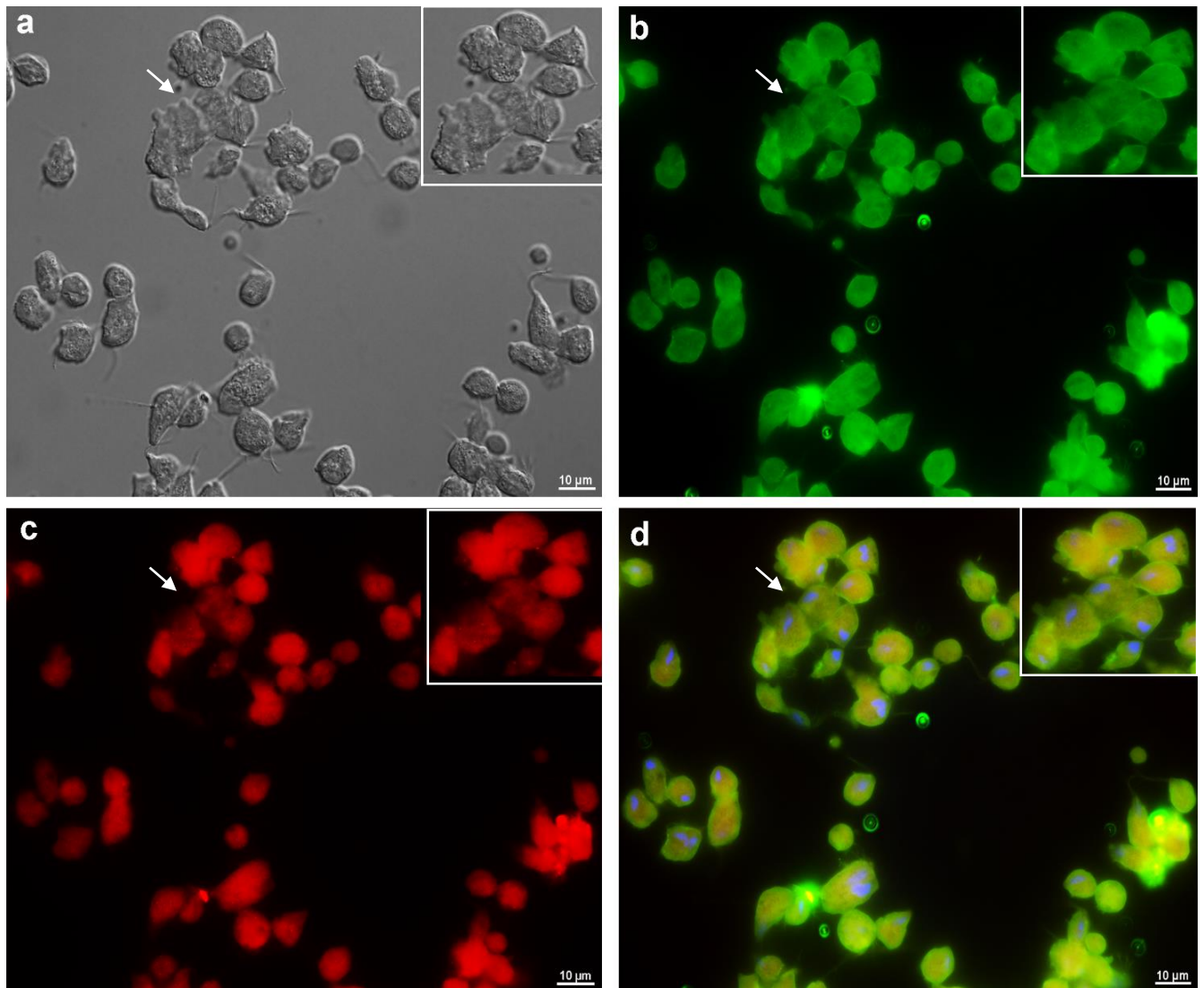
Figura 2. Cepa Jt de *T. vaginalis* não permeabilizada e permeabilizada marcada com ThS



Legenda: *T. vaginalis* observada por contraste de fase (**a, c**) e por fluorescência (**b, d**). Observa-se marcação de ThS na superfície celular (setas) e em estruturas esféricas no interior do parasito (cabeças de seta) (**a-d**). (a-b) não permeabilizado, (c-d) permeabilizado. Os núcleos (azul) foram marcados com Hoescht. Barras= 10 μm

Fonte: A autora

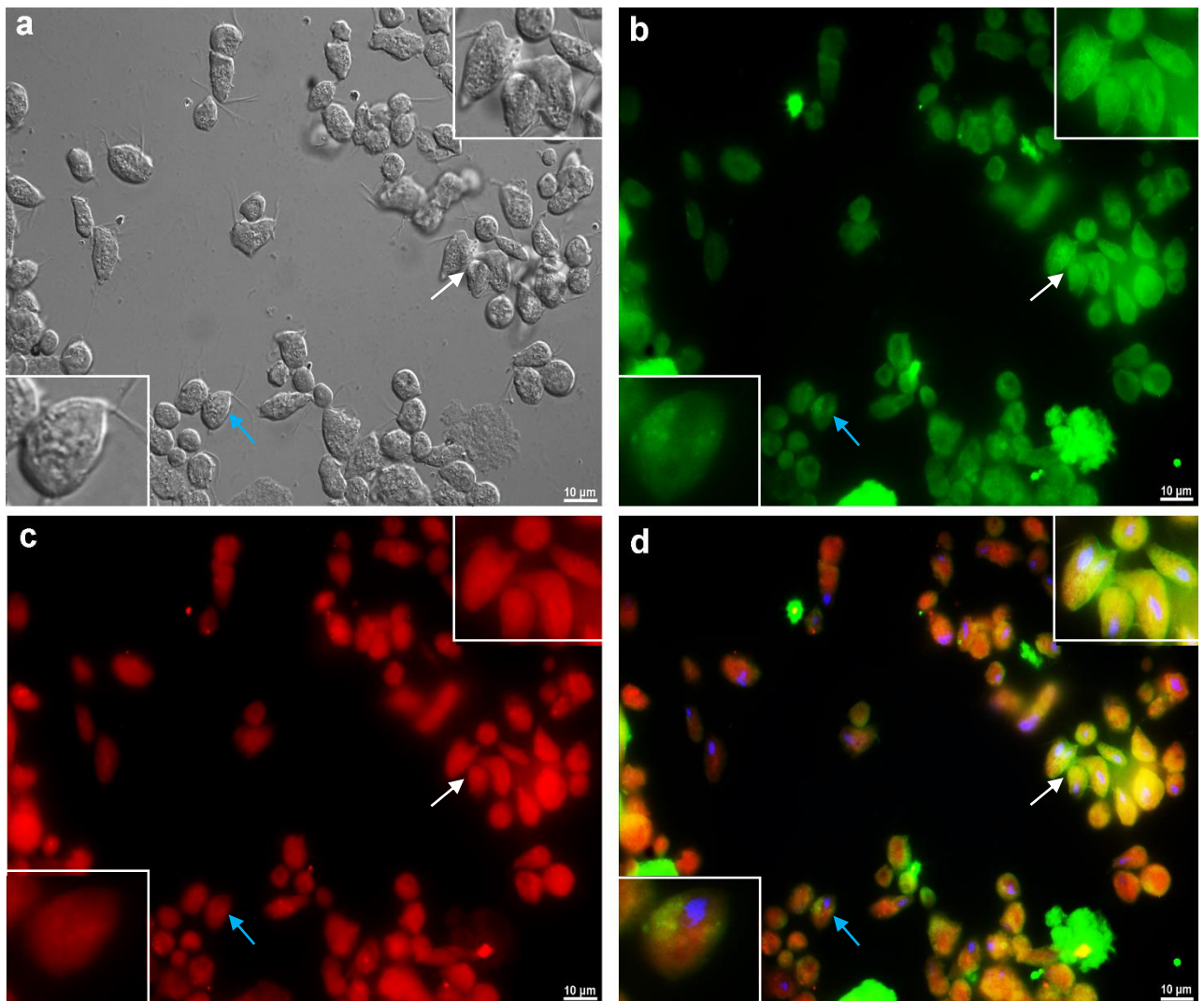
Figura 3. Ensaio de dupla marcação em *T. vaginalis* com ThS e anti-PFOR



Legenda: Parasitos observados por contraste de interferência diferencial **(a)**, e após marcação com ThS **(b)** e anti-PFOR **(c)**. **(d)** sobreposição dos sinais fluorescentes mostrando a colocalização em amarelo. Nota-se marcação de ThS **(b)** na superfície celular e em estruturas citosólicas; enquanto anti-PFOR **(c)** reconhece apenas os hidrogenossomos. No canto superior direito, observa-se o *Inset* da região apontada pela seta. Os núcleos (azul) foram marcados com Hoescht. Barras= 10 μm

Fonte: A autora

Figura 4. Ensaio de dupla marcação em *T. vaginalis* com ThS e anti-enzima málica



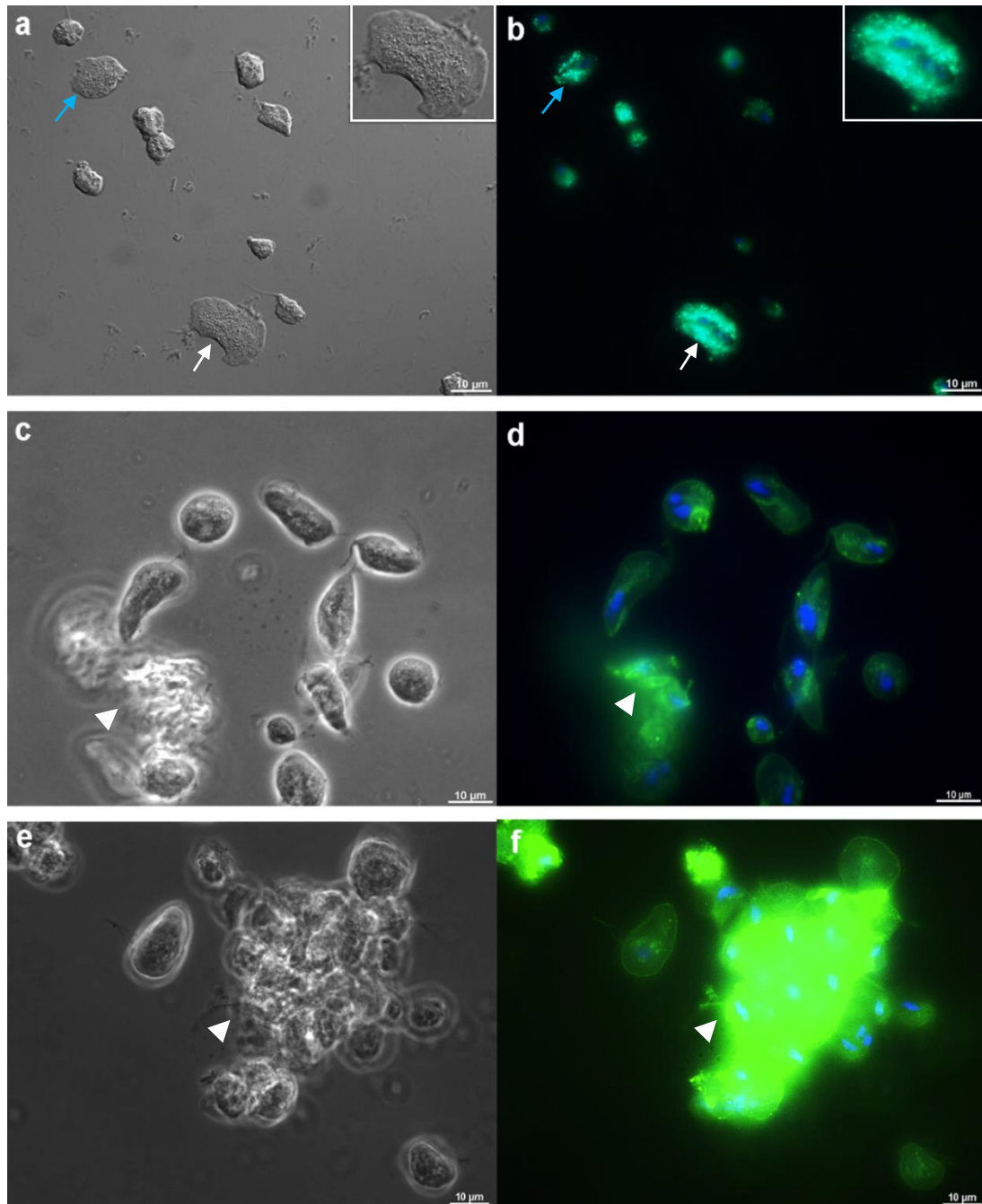
Legenda: Parasitos observados por contraste de interferência diferencial **(a)**, e após marcação com ThS **(b)** e anti-enzima málica **(c)**. **(d)** sobreposição dos sinais fluorescentes. Nota-se marcação de ThS **(b)** na superfície celular e em estruturas citosólicas; enquanto anti-enzima málica **(c)** reconhece apenas os hidrogenossomos. No canto superior direito, observa-se o *Inset* da região apontada pela seta branca mostrando a colocalização das marcações em amarelo. No canto inferior esquerdo, há o *Inset* da região apontada pela seta azul mostrando a ausência de colocalização dos sinais fluorescentes. Os núcleos (azul) foram marcados com Hoescht. Barras= 10 µm

Fonte: A autora

3.2 AS FORMAS AMEBOIDES E OS AGREGADOS CELULARES DE *T. vaginalis* APRESENTAM MAIOR INTENSIDADE DE MARCAÇÃO PARA ThS

Quando comparados com o formato piriforme, as formas ameboides de *T. vaginalis* exibiram uma marcação para ThS muito mais intensa (figura 5 a-b). Observamos também um aumento da marcação de ThS nos *clusters* celulares em comparação com o parasito livre. (figura 5 c-e). Foram utilizadas ambas as cepas para esses experimentos.

Figura 5. Parasitos na forma ameboide e *clusters* celulares marcados com ThS



Legenda: *T. vaginalis* observada por contraste de interferência diferencial (**a**), contraste de fase (**c** e **e**) e por fluorescência (**b**, **d** e **f**). Nota-se marcação de ThS na superfície celular e em estruturas esféricas no parasito. (**a-b**) note que a marcação é mais intensa nas formas ameboides (setas). Canto superior direito: *Inset* do parasito ameboide apontado pela seta branca (**c-f**). Observe que em comparação com os parasitos livres, os *clusters* celulares apresentam fluorescência mais intensa. Os núcleos (azul) foram marcados com Hoescht. Barras= 10 μ m

Fonte: A autora

3.3 A SUPERFÍCIE CELULAR, ESTRUTURAS DE SECREÇÃO E HIDROGENOSSOMOS EM *T. vaginalis* SÃO RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA AMILOIDES

Com o objetivo de corroborar a presença de estruturas semelhantes aos amiloides em *T. vaginalis*, foram realizados ensaios de imunomarcação utilizando três anticorpos que reconhecem epítomos comumente encontrados nas fibras amiloides: anti-LOC (SIGMA ALDRICH), anti-W01 e anti-W02 (cedidos pelo Dr. Ronald Wetzel). Resultados similares foram obtidos com ambas as cepas.

Inicialmente, para averiguar a especificidade e funcionalidade dos anticorpos, foram feitos ensaios de imunofluorescência e imunocitoquímica ultraestrutural utilizando as bem caracterizadas fibras amiloides da proteína α -sinucleína como controle positivo (38). Marcação positiva foi encontrada com todos os anticorpos (figura 6), indicando, portanto, que estes estavam de fato reconhecendo as fibras amiloides.

Nos ensaios de imunofluorescência com anti-LOC em parasitos não permeabilizados, uma intensa marcação foi encontrada na superfície celular (figura 7 a-b). Para descartar a possibilidade da marcação ter sido um falso positivo devido à adsorção inespecífica dos anticorpos primário ou secundário na membrana plasmática, nós realizamos dois ensaios controles. No primeiro, o anticorpo anti-LOC foi omitido e as células foram incubadas somente com o anticorpo secundário conjugado com fluorocromo. Nenhuma marcação foi observada sob essa condição (dado não mostrado), indicando, portanto, que não houve ligação inespecífica do anticorpo secundário com a superfície dos parasitos. No segundo ensaio, utilizamos como racional a propriedade das fibras amiloides serem insolúveis e resistentes a detergentes como o SDS (36). Para isso, parasitos vivos foram tratados com 1% SDS e 0,05% Tritox-100 por cinco minutos, sob leve agitação, com o intuito de se provocar danos e rompimento da membrana plasmática, sem afetar as possíveis estruturas semelhantes aos amiloides. Em seguida, as células foram fixadas e processadas normalmente para imunofluorescência com anti-LOC. Mesmo com a membrana danificada, uma intensa marcação restrita à superfície dos parasitos continuou sendo observada (figura 7 c-d), sugerindo, assim, que a ligação do anti-LOC com a superfície

de *T. vaginalis* não ocorreu por adsorção inespecífica do anticorpo na membrana plasmática.

Adicionalmente, parasitos viáveis foram fixados, permeabilizados com triton-X100 e marcados com anti-LOC. Nesses ensaios, observamos, além da superfície celular, uma intensa marcação no complexo de Golgi e em estruturas pontuais distribuídas por todo citosol (figura 8). Esses resultados foram confirmados e mais bem esclarecidos por meio de imunocitoquímica ultraestrutural em resina hidrofílica. Uma intensa marcação foi encontrada na membrana plasmática, complexo de Golgi e em estruturas vesiculares que correspondem aos corpos multivesiculares (figura 9). Além disso, marcação positiva foi observada também em estruturas semelhantes a fibras e vesículas localizadas no meio extracelular (figura 10).

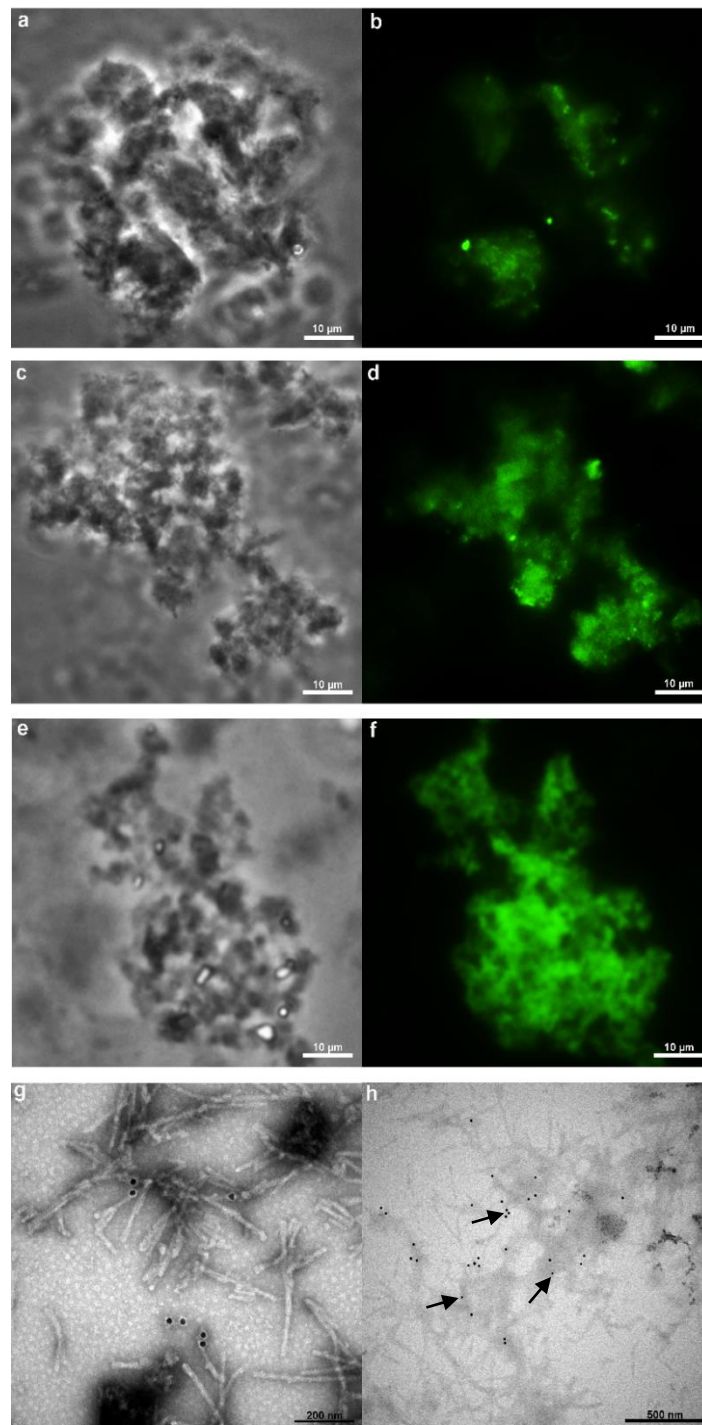
A marcação positiva em corpos multivesiculares e nas estruturas semelhantes a vesículas no meio extracelular sugerem que o anticorpo estaria reconhecendo VEs secretadas por *T. vaginalis*. Para investigar isso, ensaios de imunocitoquímica para anti-LOC foram realizados em amostras purificadas de VEs. Marcação positiva foi encontrada em exossomos (figura 11a), microvesículas (figura 11b) e corpos multivesiculares contendo exossomos (figura 11c), confirmando, portanto, os dados encontrados em resina hidrofílica (figura 10).

Resultados similares ao anti-LOC foram obtidos quando utilizamos os anticorpos anti-W0. O perfil de marcação de anti-W01 e anti-W02 foram similares. Por imunofluorescência, uma intensa marcação foi encontrada na superfície celular e em estruturas citosólicas (figura 12). Contudo, a marcação foi heterogênea, sendo mais forte em algumas células e praticamente inexistente em outras (figura 12). Por imunocitoquímica, marcação positiva foi observada em retículo endoplasmático, complexo de Golgi (figura 13a), corpos multivesiculares (figura 13b) e VEs (figura 13c). Quando analisados em conjunto, os resultados acima indicam a presença de estruturas semelhantes a amiloides nas organelas envolvidas na maquinaria de secreção em *T. vaginalis*. Curiosamente, diferente do que foi encontrado com anti-LOC, os anticorpos anti-W0 marcaram também os hidrogenossomos (figura 13d), de maneira similar a ThS (figuras 3 e 4).

Adicionalmente, realizamos ensaios de dupla marcação entre os anticorpos anti-LOC e anti-W02 (figura 14), bem como entre anti-W01 e Ths (figura 15), com o objetivo de determinar se haveria co-localização. Surpreendentemente, a marcação do anti-LOC foi completamente abolida nos ensaios com anti-W02 (figura 14),

sugerindo que poderia haver uma competição pelos sítios de reconhecimento dos anticorpos. Contudo, mais ensaios estão sendo realizados para determinar isso. Entretanto, nos ensaios com anti-W02 e ThS, observamos colocalização em regiões da superfície e citosol de algumas células, principalmente nos *clusters* celulares, onde a intensidade de fluorescência foi maior para ambos marcadores (figura 15).

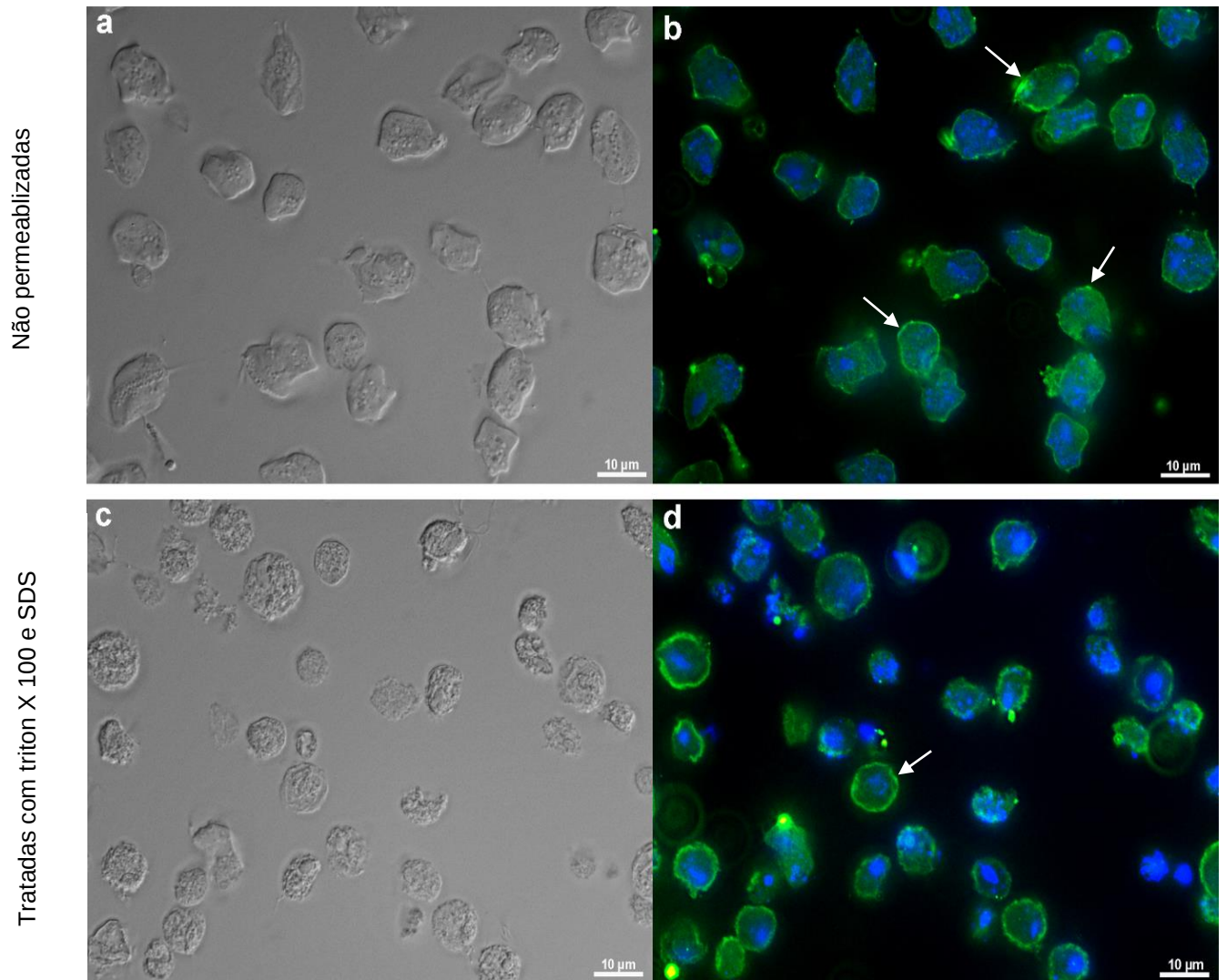
Figura 6. Agregados amiloides da proteína α -sinucleína marcadas com anti-LOC, anti-W01 e anti-W02



Legenda: (a-f) Agregados de α -sinucleína observados por contraste de fase (a, c e e) e fluorescência (b, d e f), após marcação por anti-LOC (b), anti-W01 (d), anti-W02 (f). (g-h) Imunocitoquímica ultraestrutural. Observa-se marcação positiva (setas) para anti-LOC (g) e anti-W01 (h) nas fibras amiloides. Barras: (a-d) 10 µm; (e-f) 5 µm; (g) 200 nm; (h) 500 nm.

Fonte: A autora

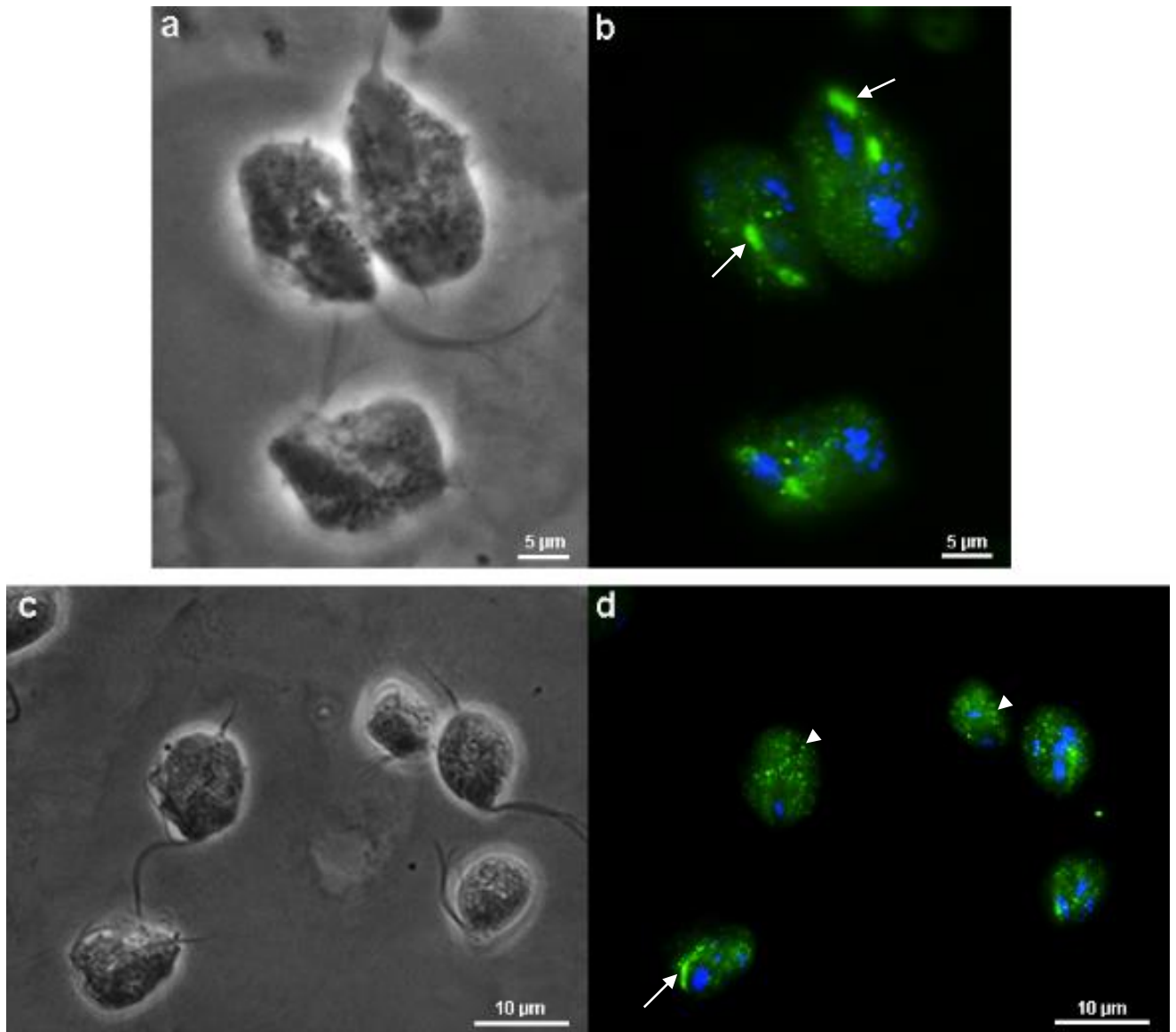
Figura 7. *T. vaginalis* não permeabilizada e tratadas antes da fixação marcadas com anti-LOC



Legenda: *T. vaginalis* observada por contraste de interferência diferencial (**a, c**) e por fluorescência (**b, d**). Observa-se marcação do anti-LOC na superfície celular (seta). Os núcleos (azul) foram marcados com Hoescht. Barras= 10 μm

Fonte: A autora

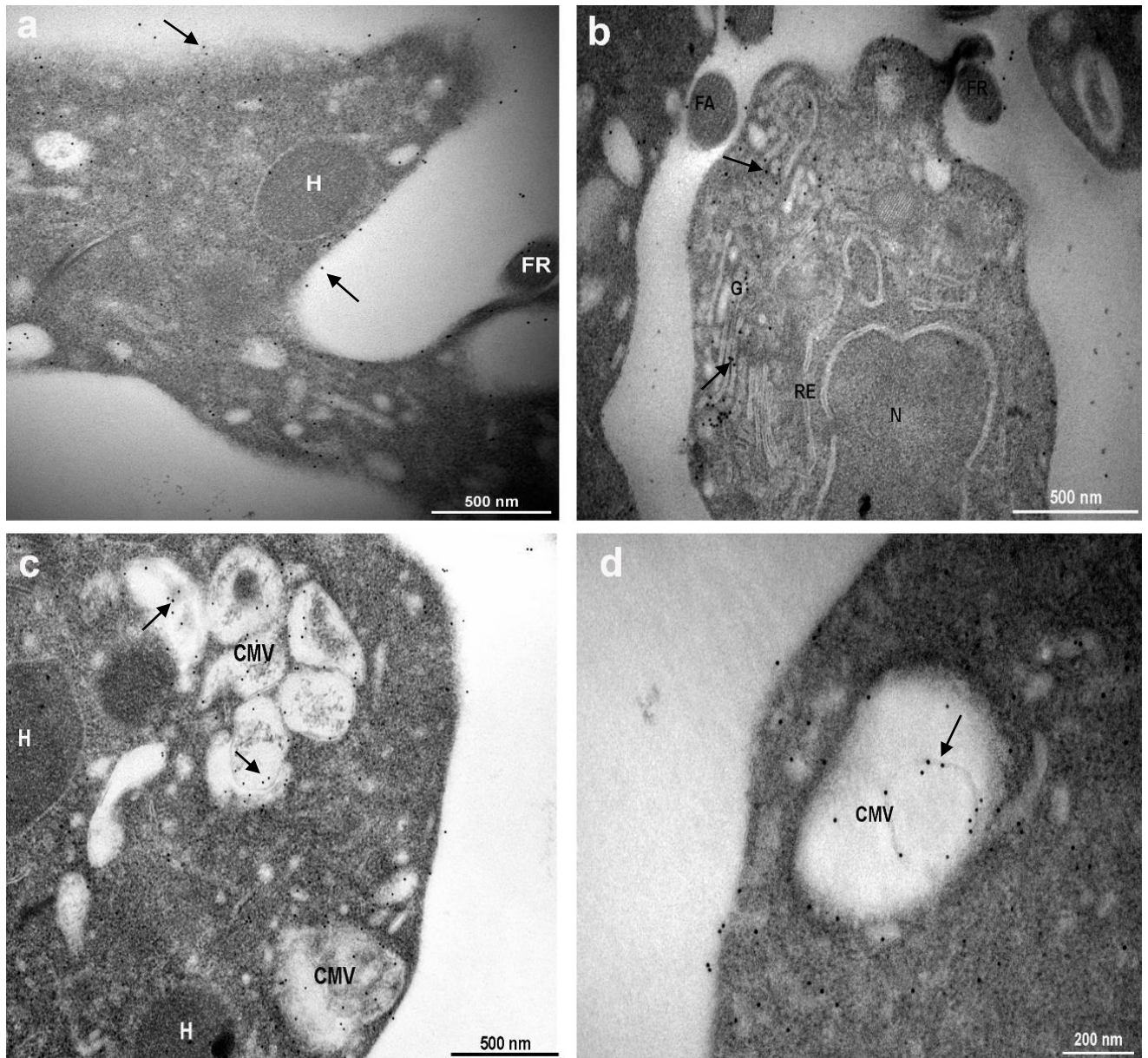
Figura 8. *T. vaginalis* permeabilizadas marcadas com anti-LOC



Legenda: *T. vaginalis* observada por contraste de fase (a, c) e por fluorescência (b, d). Observa-se marcação do anti-LOC no complexo de Golgi (setas) e em estruturas pontuais (cabeça de seta). Os núcleos (azul) foram marcados com Hoescht. Barras= (a-b) 5 μm; (c-d) 10 μm.

Fonte: A autora

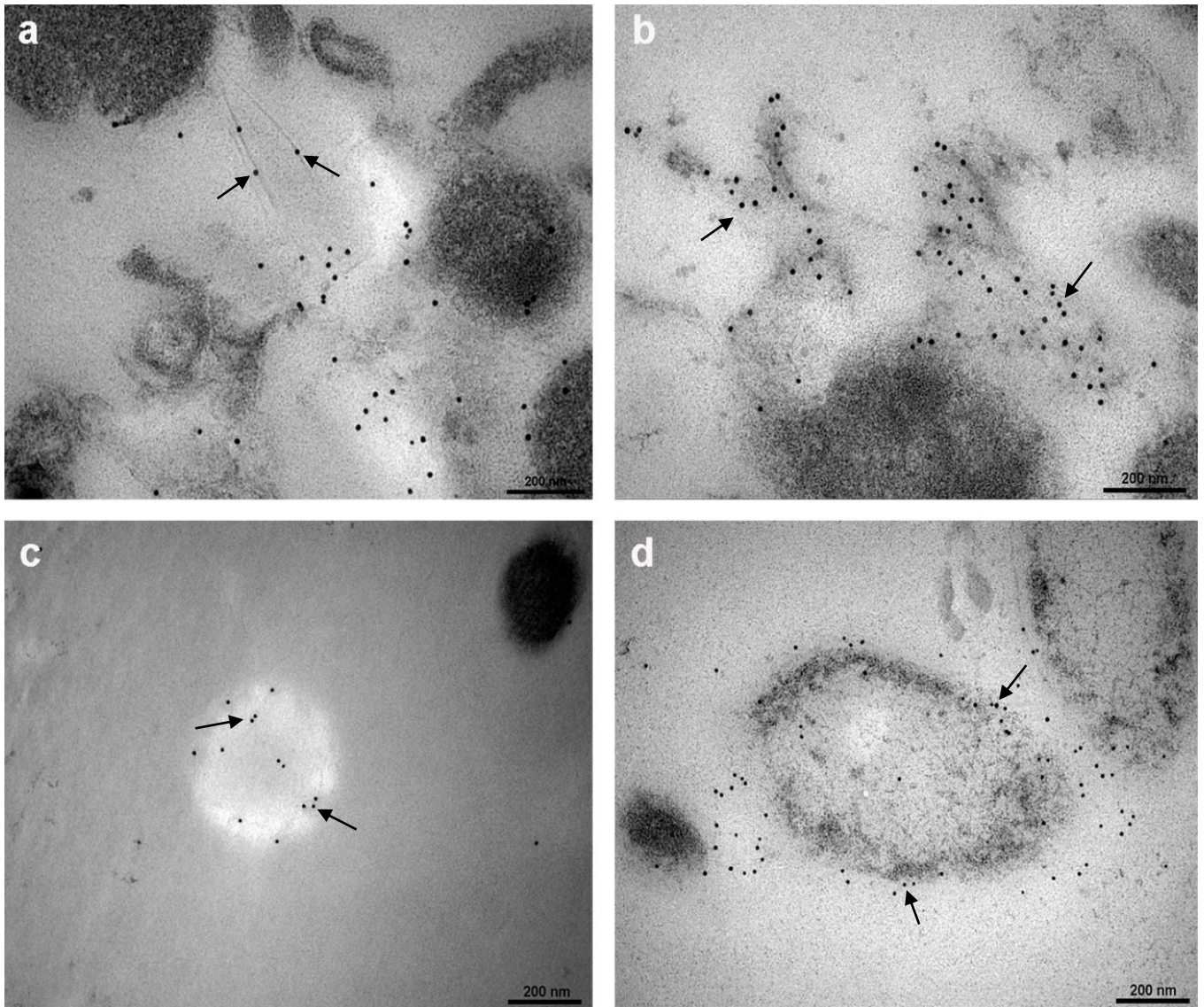
Figura 9. Imunocitoquímica ultraestrutural de *T. vaginalis* com anti-LOC



Legenda: Nota-se a presença de partículas de ouro coloidal 10 nm (setas) na membrana plasmática **(a)**, complexo de Golgi (G) **(b)**, e corpos multivesiculares (CMV) **(c, d)**. Flagelo anterior (FA), flagelo recorrente (FR), hidrogenossomo (H), núcleo (N), retículo endoplasmático (RE). Barras= **(a-c)** 500nm; **(d)** 200nm.

Fonte: A autora

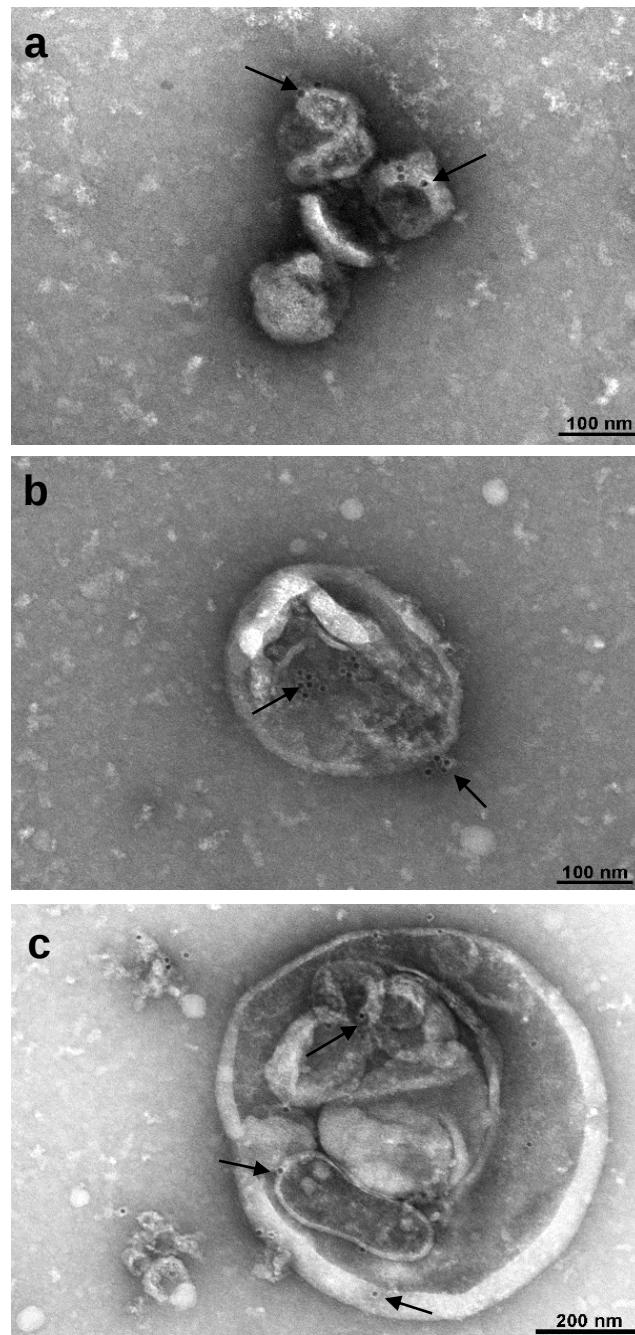
Figura 10. Imunocitoquímica ultraestrutural de *T. vaginalis* com anti-LOC marcando estruturas semelhantes a fibras e VEs



Legenda: Nota-se a presença de partículas de ouro coloidal 10 nm (setas) em estruturas semelhantes a fibras (**a, b**) e estruturas semelhantes às vesículas extracelulares (**c, d**), Barras= 200nm

Fonte: A autora

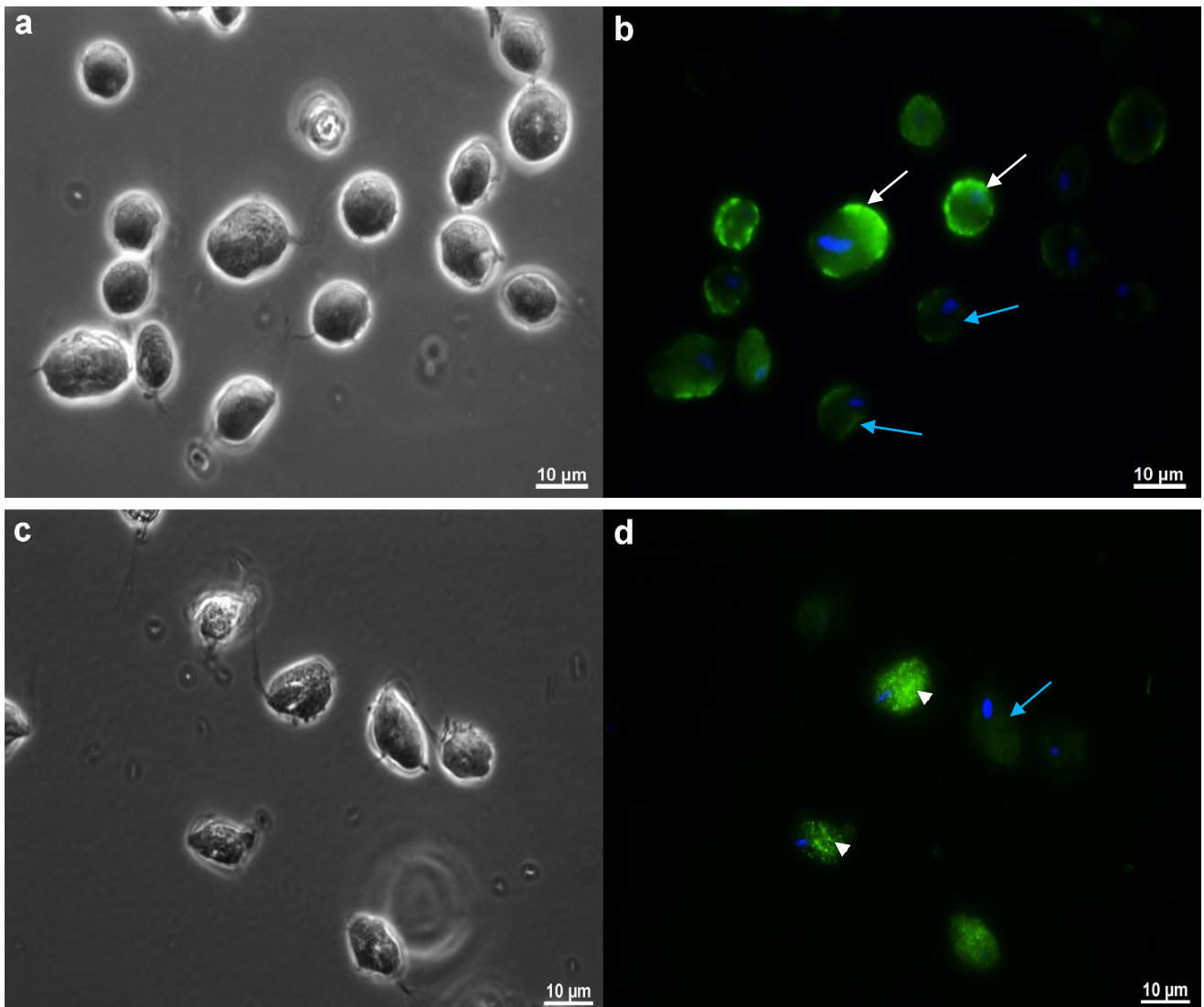
Figura 11. Imunocitoquímica ultraestrutural de amostras purificadas de VEs de *T. vaginalis* com anti-LOC



Legenda: Partícula de ouro coloidal 10 nm (setas) podem ser observadas em exossomos **(a)**, microvesículas **(b)** e corpos multivesiculares com exossomos **(c)**. Barras= **(a-b)** 100nm; **(c)** 200nm.

Fonte: A autora

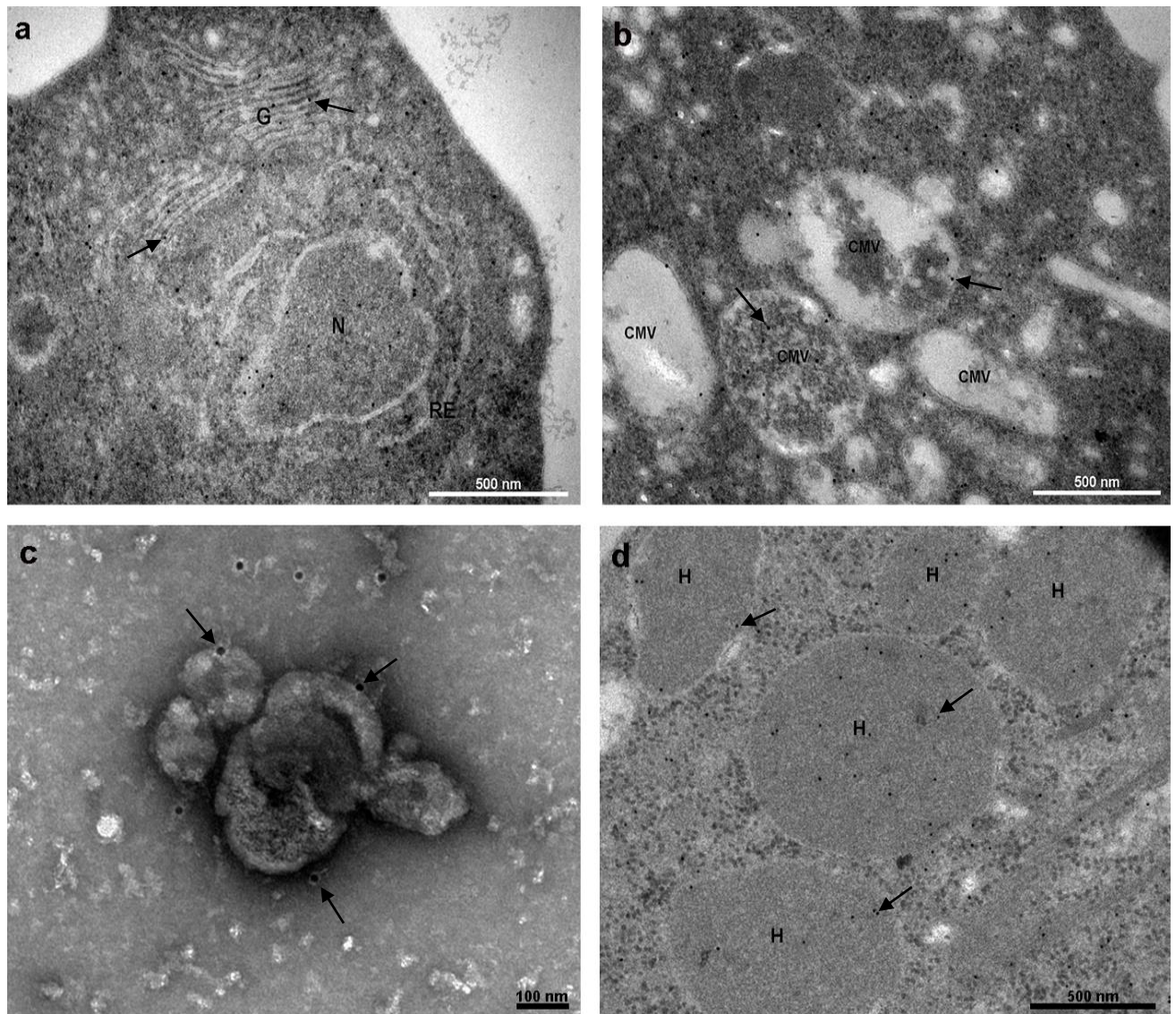
Figura 12. *T. vaginalis* marcada com os anticorpos anti-W0



Legenda: *T. vaginalis* observada por contraste de fase (**a, c**) e por fluorescência (**b, d**). Observa-se marcação na superfície celular (seta branca) (**b**) e em estruturas citosólicas (pontas de seta) (**d**). Note que o perfil de marcação é heterogêneo, sendo mais fraco e, até mesmo inexistente em algumas células (seta azul). Os núcleos (azul) foram marcados com Hoescht. Barras= (**a-b**) 20 μm ; (**c-d**) 10 μm .

Fonte: A autora

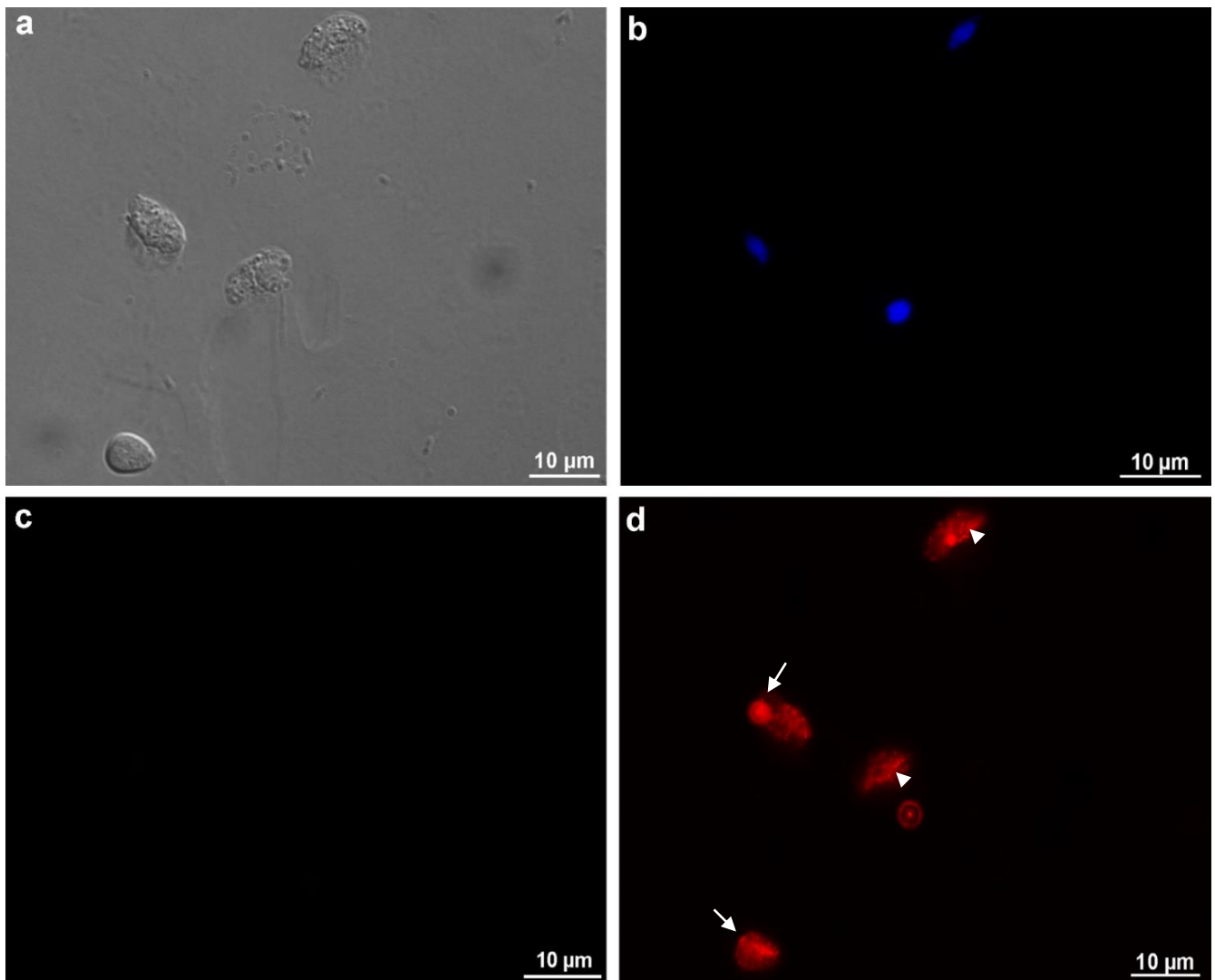
Figura 13. Imunocitoquímica ultraestrutural de *T. vaginalis* com os anticorpos anti-WO



Legenda: Bolinhas de ouro coloidal 10 nm (setas) podem ser observadas retículo endoplasmático e complexo de Golgi **(a)**, corpos multivesiculares (CMV) **(b)**, VEs provenientes de fração purificada **(c)** e hidrogenossomos (H) **(d)**. Complexo de Golgi (G), núcleo (N), retículo endoplasmático (RE), Barras= **(a, b e d)** 500 nm; **(c)** 100nm.

Fonte: A autora

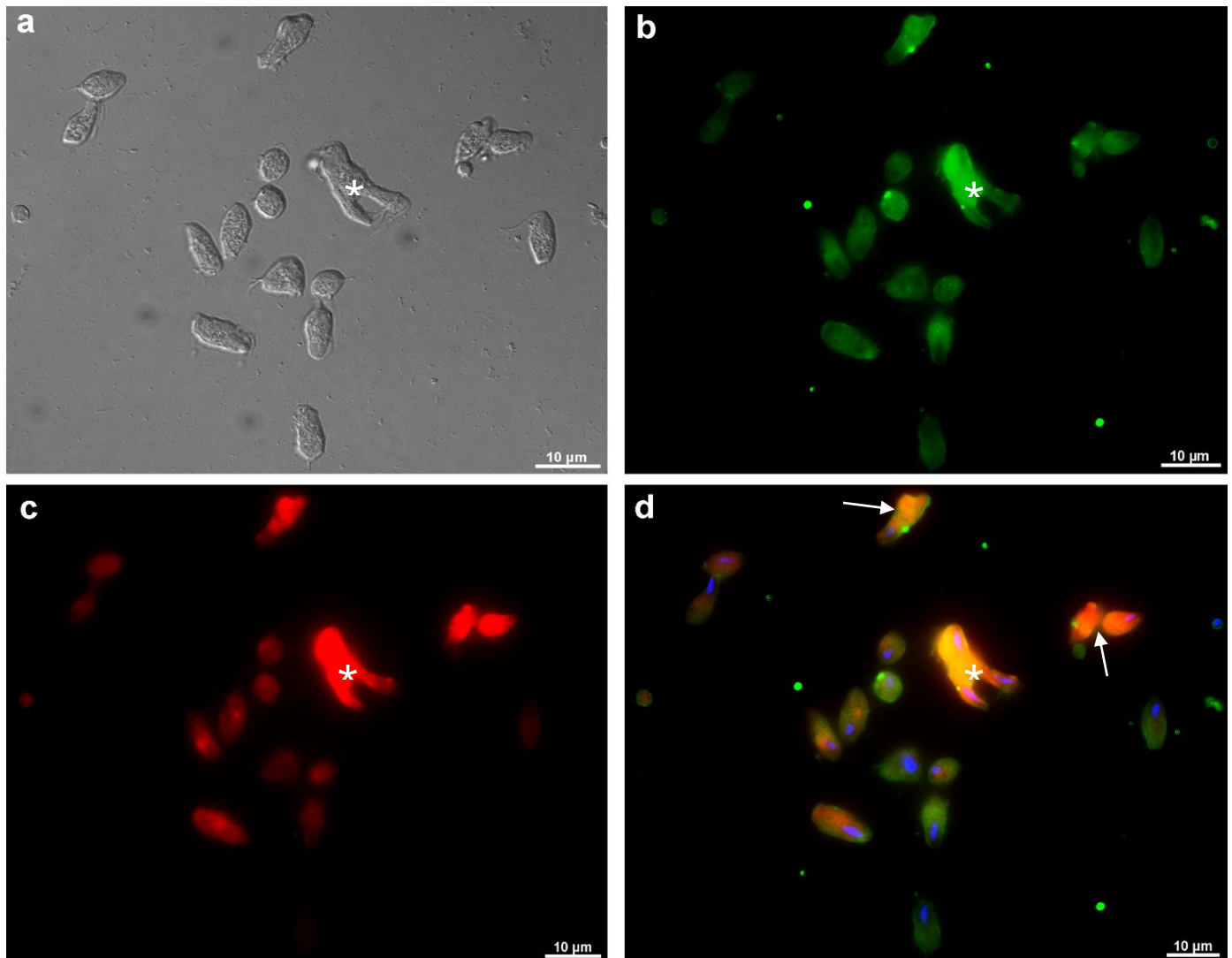
Figura 14. Ensaio de dupla marcação de *T. vaginalis* com anti-LOC e anti-W02



Legenda: *T. vaginalis* observada por contraste de interferência diferencial **(a)**, Hoescht **(b)**, anti-LOC **(c)**, anti-W02 **(d)**. Não há marcação com anti-LOC **(c)**, enquanto marcação positiva na superfície celular (setas) e em estruturas citosólicas (cabeças de seta) pode ser observada com anti-W02 **(d)**. Os núcleos (azul) foram marcados com Hoescht. Barras= 10 µm

Fonte: A autora

Figura 15. Ensaio de dupla marcação de *T. vaginalis* ThS e anti-WO



Legenda: *T. vaginalis* observada por contraste de interferência diferencial **(a)** e após marcação com ThS **(b)** e anti-WO1 **(c)**. Observa-se em **(d)** colocalização da fluorescência (amarelo) em regiões da superfície celular e citosol de algumas células (setas). Note que a intensidade de fluorescência e de colocalização é maior no cluster celular (asterisco). Os núcleos (azul) foram marcados com Hoescht. Barras= 10 μm

Fonte: A autora

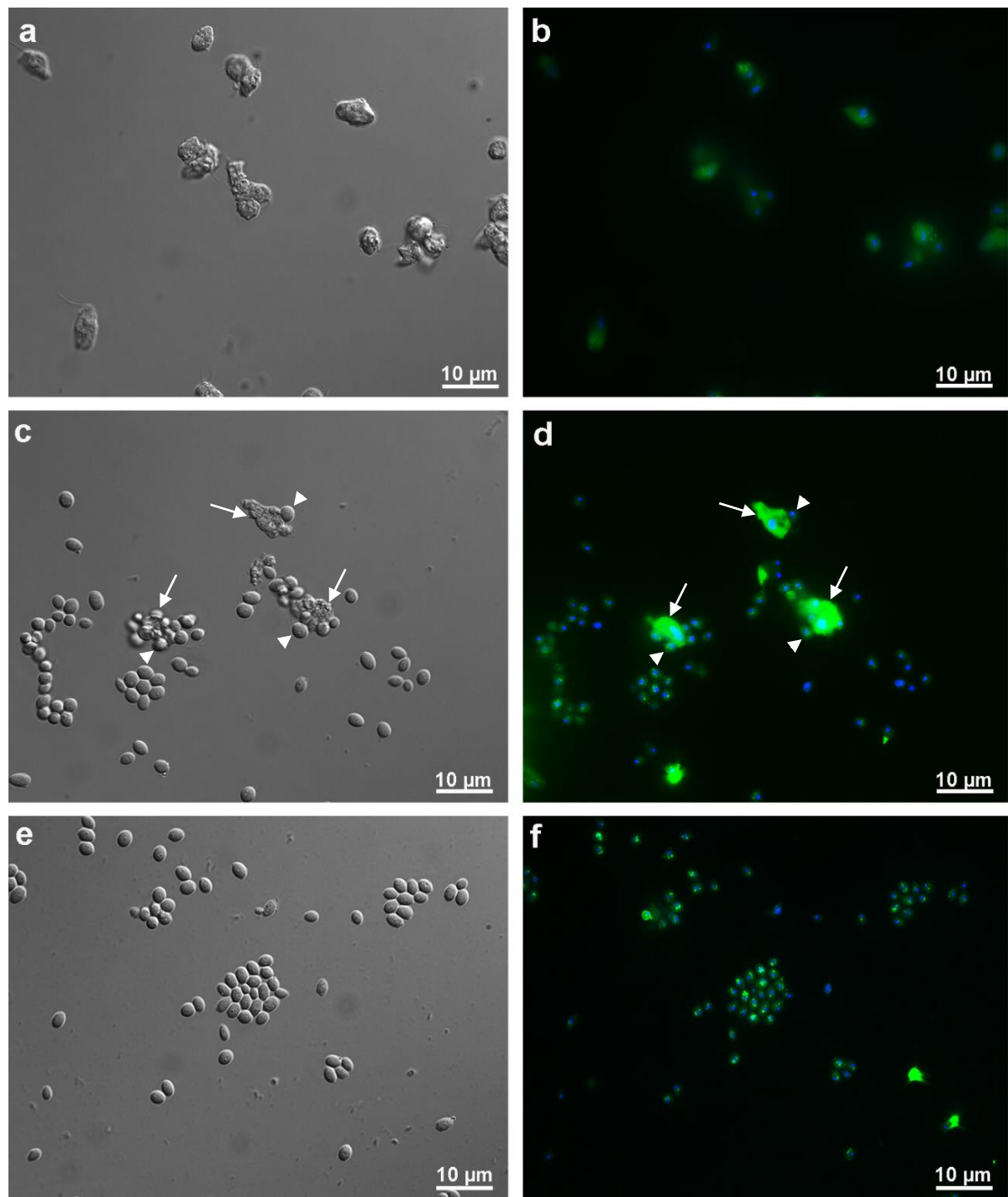
3.4 *T. vaginalis* APRESENTA MAIOR INTENSIDADE DE MARCAÇÃO PARA AMILOIDES APÓS INTERAÇÃO COM LEVEDURA

Para investigar a possível participação de estruturas semelhantes aos amiloides durante a interação de *T. vaginalis* com outros microrganismos, parasitos foram co-incubados com *Saccharomyces cerevisiae* por 30 min e marcados com ThS. As leveduras foram escolhidas para esses ensaios, porque sua interação com tricomonas já é bem conhecida (39). Resultados similares foram obtidos com parasitos permeabilizados e não permeabilizados com triton X-100. Quando comparado com os parasitos controle (figura 16 a-b), verificamos um aumento da marcação de ThS em *T. vaginalis* após a interação com as leveduras (figura 16 c-d). Esse resultado sugere que houve um aumento das estruturas semelhantes aos amiloides nos parasitos após co-incubação com *S. cerevisiae*. As leveduras apresentaram o padrão de marcação característico das estruturas amiloides já descritas para este microrganismo (figura 16 e-f) (21, 40).

3.5 *T. vaginalis* APRESENTA MAIOR INTENSIDADE DE MARCAÇÃO PARA AMILOIDES APÓS INTERAÇÃO COM CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Para verificar se durante o processo de interação de *T. vaginalis* com as células hospedeiras haveria a participação de estruturas semelhante aos amiloides, foram realizados ensaios de interação parasito-célula epitelial vaginal seguido de marcação com ThS. Quando comparado com - *T. vaginalis* em cultura axênica (figura 17 a-b), os resultados mostraram que houve aumento de marcação de ThS nos parasitos após a interação com a célula hospedeira (figura 17 c-f). Além disso, observamos uma alteração do padrão de marcação na superfície do parasito após o contato com a célula epitelial vaginal. A marcação se mostrou mais forte em determinados pontos da superfície celular de *T. vaginalis*, que poderiam corresponder as áreas de contato do parasito com a célula-alvo (figura 17 e-f). Portanto, esses resultados sugerem que houve um aumento das estruturas semelhantes aos amiloides em *T. vaginalis* após interação com células hospedeiras.

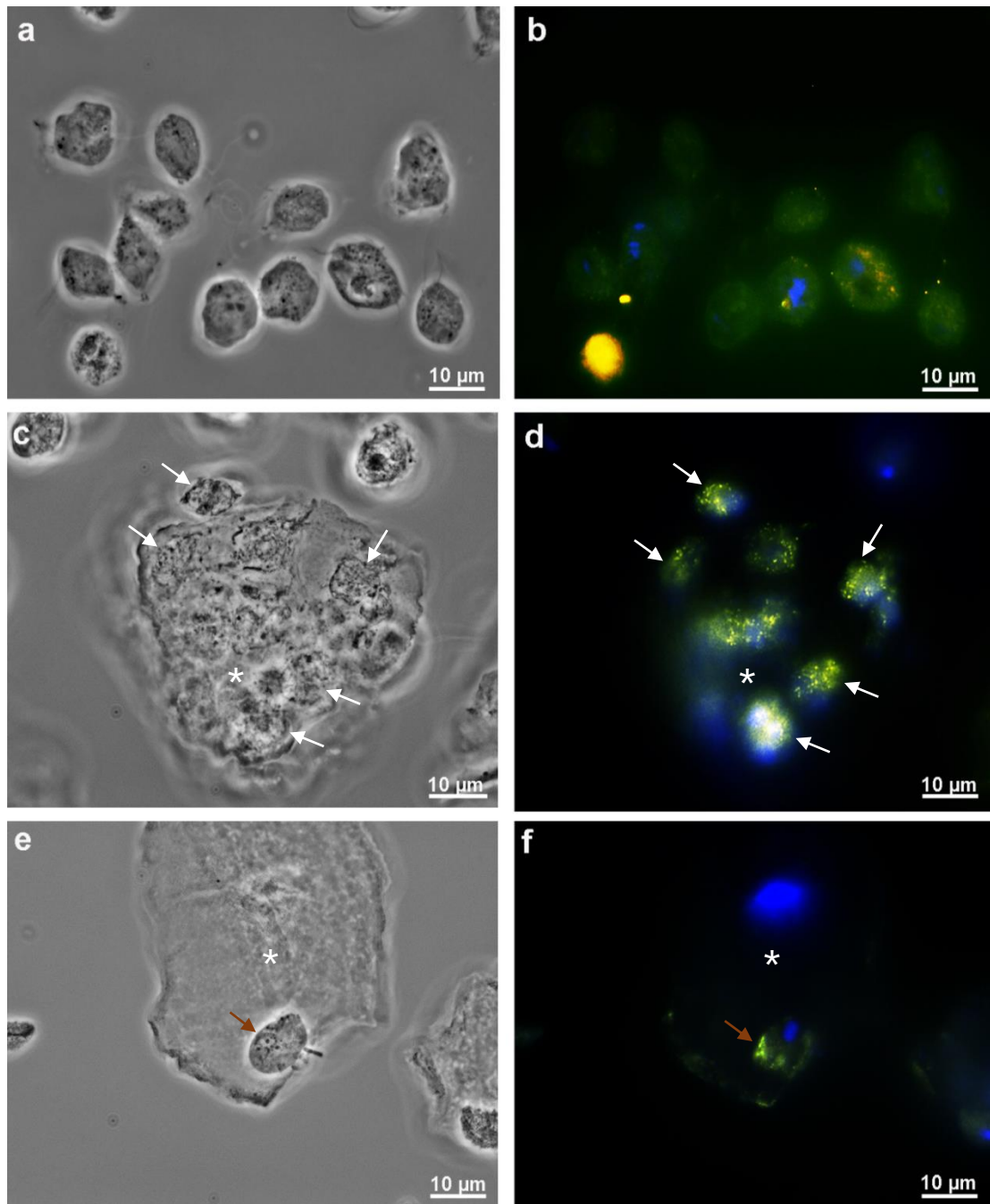
Figura 16. Interação *Trichomonas*-levedura com ThS



Legenda: *T. vaginalis* controle (**a-b**), e após 30 min de co-incubação com as leveduras (**c-d**). Nota-se uma intensa marcação de *T. vaginalis* (setas) após contato com as leveduras (cabeça de seta) (**d**). *S. cerevisiae* controle (**e-f**). Primeira coluna: contraste de interferência diferencial; Segunda coluna: ThS. Os núcleos (azul) foram marcados com Hoescht Barras= 10 μm .

Fonte: A autora

Figura 17. Interação *Trichomonas*-célula-hospedeira com ThS



Legenda: *T. vaginalis* controle (a-b) e após 30 min de co-incubação com célula epitelial vaginal (c-f). Primeira coluna: contraste de interferência diferencial; segunda coluna: ThS. Note o aumento de marcação de ThS nos parasitos (setas brancas) após a interação com a célula hospedeira (asterisco). (e-f) Observe a marcação mais forte em determinados pontos da superfície celular de *T. vaginalis*, que poderiam corresponder as áreas de contato do parasito com a célula-alvo (seta marrom). Os núcleos azul foram marcados com Hoescht. Barras= 10 µm.

Fonte: A autora

3.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS PROTEICAS DE *T.vaginalis*

Como *T. vaginalis* é um parasito extracelular, moléculas presentes em sua superfície são de extrema importância na interação com o hospedeiro. Dessa forma, para poder identificar se as proteínas envolvidas na citoaderência e citotoxicidade do parasito apresentariam potencial amiloidogênico, as sequências primárias de 626 proteínas conhecidamente encontradas na superfície de *T. vaginalis* (33) foram adquiridas em <http://trichdb.org/trichdb/>. Estas sequências foram analisadas em dois algoritmos especificamente construídos para calcular a propensão das proteínas em sofrer agregação amiloide: (a) TANGO (<http://tango.crg.es/>); e (b) AGGRESCAN (34). Inicialmente, as análises foram realizadas pelo programa TANGO. Entretanto, este algoritmo não se mostrou satisfatório já que computa até apenas 500 aminoácidos por sequência e muitas das proteínas de *T. vaginalis* selecionadas excedem o limite do programa. Além disso, o TANGO analisa as sequências hidrofóbicas sem distingui-las das regiões dos domínios transmembrana. Devido às razões mencionadas acima, optou-se por proceder com as análises utilizando o programa AGGRESCAN.

O AGGRESCAN computa até 1.000 aminoácidos por sequência, prediz e avalia a presença de *hotspots* de agregação em sequências proteicas. Este algoritmo consegue distinguir as regiões de domínios transmembranas e é capaz de predizer o grau de "desordem" das sequências com o objetivo de verificar se os *hotspots* estariam ou não em regiões altamente enoveladas (34). Após as análises, as proteínas encontradas na superfície de *T. vaginalis* foram ranqueadas por um parâmetro onde valores positivos sugerem uma propensão geral de alta agregação amiloide, enquanto valores negativos sugerem uma propensão geral de baixa agregação amiloide (Tabela 1 – material suplementar).

De 626 proteínas selecionadas, 510 foram analisadas pelo AGGRESCAN por conterem até 1.000 aminoácidos por sequência. Dessas 510 proteínas, 191 proteínas foram ranqueadas positivamente, enquanto 319 foram ranqueadas negativamente (Tabela 1 – material suplementar). De 191 proteínas positivamente ranqueadas, 24 são proteínas conhecidamente envolvidas na citoaderência e citotoxicidade de *T. vaginalis* (Tabela 1 – realces em amarelo), dentre as quais destacamos:

- 5 isoformas de tetraspaninas
- 5 isoformas da adesina BspA-like;
- 3 isoformas da adesina AP51 (subunidade β da Succinil-CoA sintetase, ligase ou tiokinase);
- 3 isoformas da adesina AP33 (subunidade α da Succinil-CoA sintetase, ligase ou tiokinase);
- 1 cisteíno-proteinase legumina-like;
- 1 isoforma da adesina AP65 (enzima málica);
- 1 isoforma da proteína variante de superfície P270.

44 proteínas envolvidas na citoaderência foram negativamente ranqueadas (Tabela1 – realces em azul), dentre as quais se destacam:

- 7 isoformas da proteína variante de superfície P270;
- 5 isoformas da adesina AP65 (enzima málica);
- 1 isoforma da adesina AP51(subunidade β da Succinil-CoA sintetase, ligase ou tiokinase).

Esses resultados foram confirmados utilizando outros dois algoritmos: o MetAmyl e o AmylPred2 (dados não mostrados)

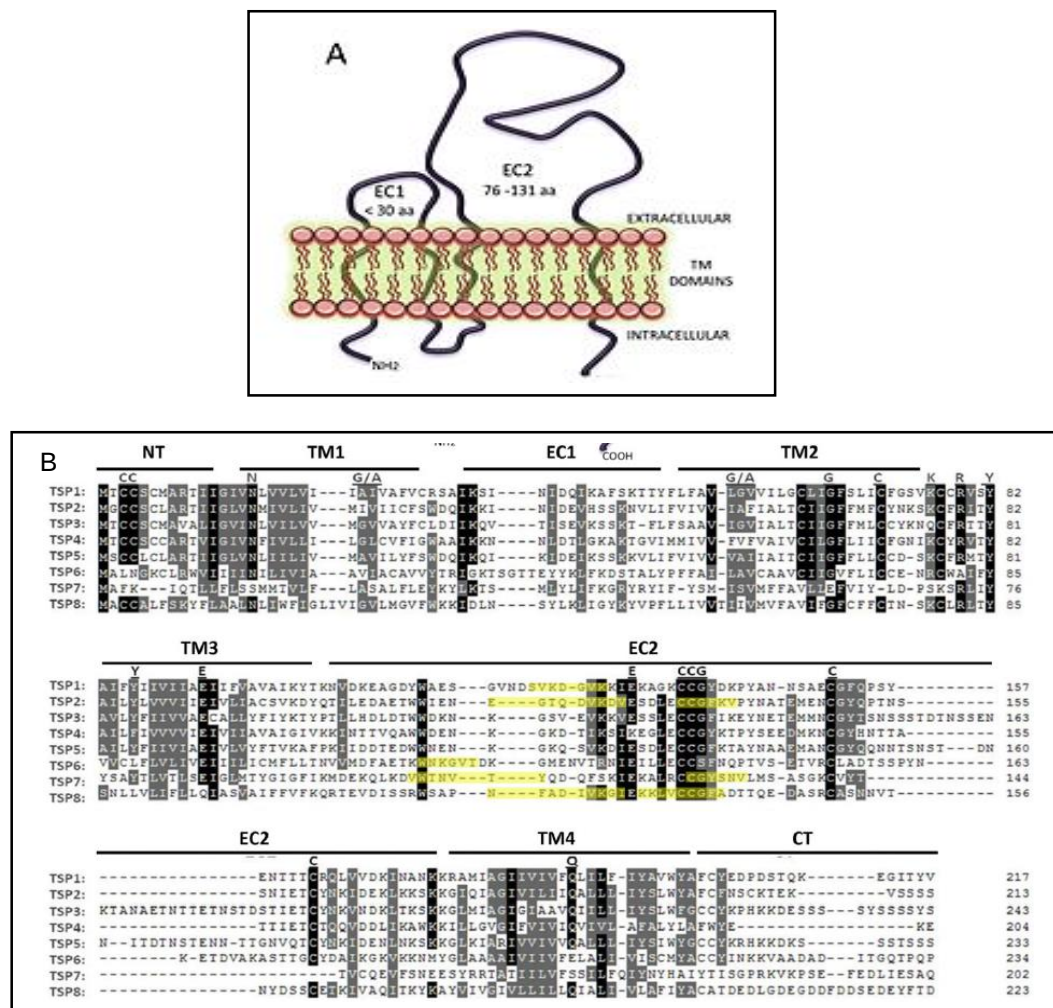
3.7 MUTAÇÕES NO *hotspot* AMILOIDOGÊNICO DA TETRASPANINA TVTSP8 DIMINUEM A FORMAÇÃO DOS *CLUSTERS* DE *T. vaginalis*

Tetraspaninas (TSPs) são proteínas transmembranas que se caracterizam por suas similaridades em tamanho (aproximadamente 20-30 kDa) e topologia (dois domínios extracelulares, sendo um pequeno-EC1 e outro grande-EC2; quatro domínios transmembranas; e um curta extremidade N- e C-terminal) (figura 18a) (11). Até o presente momento, já foram identificadas oito isoformas de TSPs em *T. vaginalis* (TvTSPs) e estas exercem importante papel na citoaderência (11).

Nossos dados de bioinformática utilizando o AmylPred2 mostraram que cinco TvTSPs exibem resíduos com potencial amiloidogênico no domínio EC2 (figura 18b). Contudo uma análise mais refinada utilizando Aggrescan, mostrou que, dentre as

cinco TSPs, TvTSP8 é a que apresenta o maior potencial para formar amiloides. O resíduo Val135 em TvTSP8 imediatamente antes do domínio CCG torna essa TSP com um potencial amiloidogênico muito maior quando comparado com as demais TvTSPs (figura 18b).

Figura 18. Representação esquemática da estrutura típica e análise das sequências das TSPs



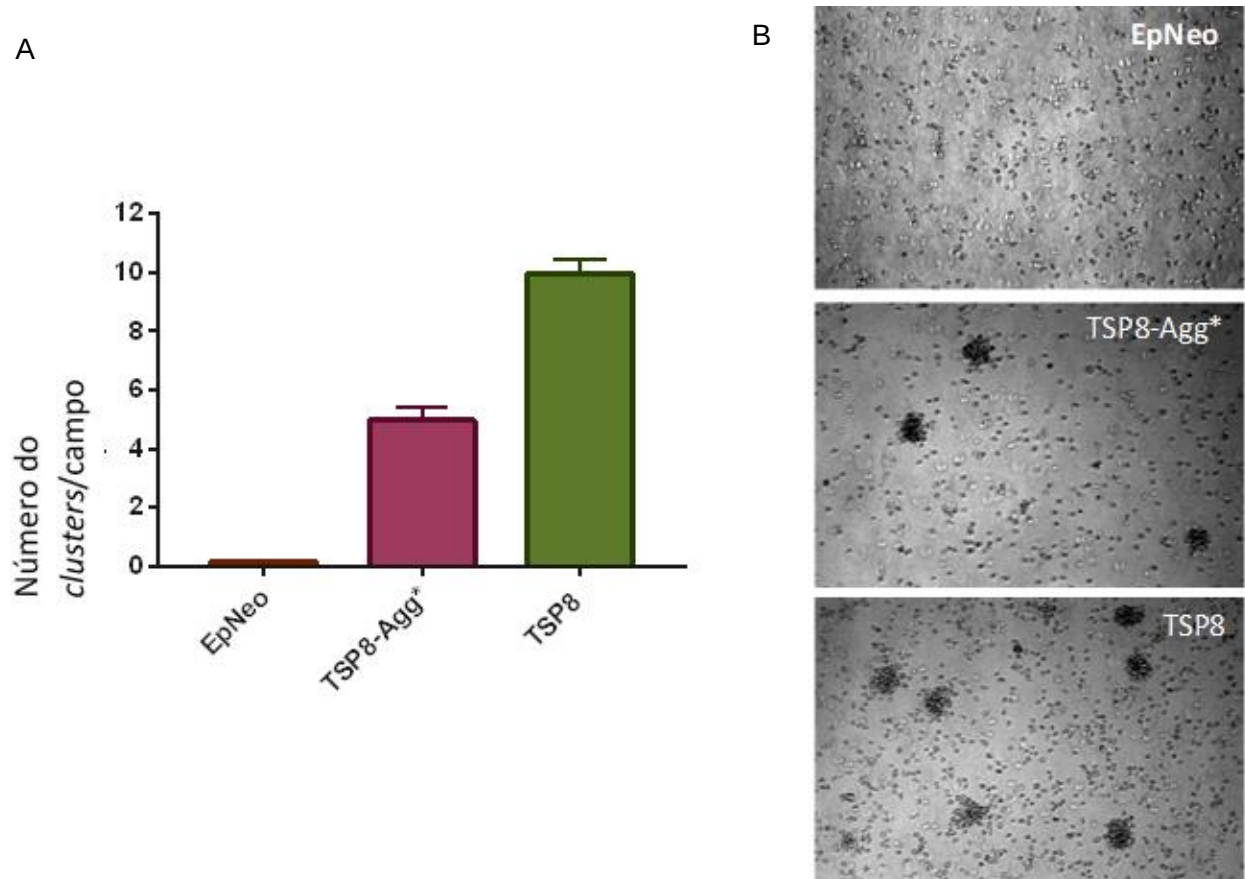
Legenda: (a) Representação esquemática da estrutura típica das TSPs. (b) Análises das sequências das TvTSPs. Os aminoácidos destacados em amarelo são previstos para formar agregados amiloides de acordo com AmyIPred2. Apenas os domínios EC1 e EC2 foram considerados nas análises. As caudas N- e C-terminal não foram consideradas, pois ambas estão localizadas em ambiente citosólico e, provavelmente, não participam da adesão de célula-célula. As regiões transmembranares também não foram analisadas porque o algoritmo reconhece artefactualmente esses domínios como regiões potenciais para formar amiloides devido à alta hidrofobicidade dos aminoácidos.

Fonte: Figura adaptada de COCERES et al., 2015

Sabe-se que a expressão exógena de TvTSP8 aumenta o número de *clusters* de parasitos nas culturas axênicas, sugerindo que esta TSP exerça um papel na formação de *cluster* celular (11). Simulações realizadas pelos algoritmos Aggrescan e AmylPred2 mostraram que a substituição do resíduo Val (V) por Glu (E) na posição 135 (V135E) de TvTSP8 diminui seu potencial previsto de agregação amiloide (dado não mostrado). Portanto, com o objetivo de verificar se a mutação V135E poderia interferir na formação de *clusters* de parasitos, genes de TvTSP8 selvagem e mutantes (TvTSP8agg) foram clonados e expressos em *T. vaginalis* utilizando vetor de α -SCS-NEO (α -succinil coenzima A sintetase - Neomicina fosfotransferase). O número de clusters de parasitos por campo do microscópico foram contados utilizando um microscopio óptico de contraste de fase, objetiva de 10X.

Como esperado, o número de *clusters* nos parasitos expressando TvTSP8 foi cerca de dez vezes maior do que o encontrado nos parasitos transfectados com o vetor vazio (EpNEO). Contudo, em *T. vaginalis* expressando TvTSP8agg, a quantidade de clusters/campo foi reduzida pela metade quando comparado com os parasitos que expressavam a proteína selvagem (figura 19). Este resultado sugere, portanto, que os resíduos de aminoácidos de TvTSP8 previstos com potencial amiloidogênico poderiam estar envolvidos na formação de clusters celulares de *T. vaginalis*. Mais estudos estão em andamento para esclarecer este tópico.

Figura 19. Muta  o na sequência amiloidogênica de TvTSP8 interfere na forma  o de *clusters*



Legenda: **(a)** Análise quantitativa e **(b)** imagens representativas por microscopia de contraste de fase do número de clusters de parasitos após transfec  o e expressão exógena de TSP8-Agg (mutada), e TSP8 (selvagem). EpNeo, vetor vazio. Nota-se uma redu  o pela metade do número de clusters nos parasitos expressando TSP8-Agg quando comparados com TSP8 selvagem.

Fonte: A autora

4. DISCUSSÃO

Estudos referentes aos amiloides funcionais em microrganismos vêm ganhando cada vez mais importância devido ao papel desses agregados proteicos nas intera  o  s célula-célula e como fatores de citoaderência para o estabelecimento de patógenos nos hospedeiros (21, 27, 28). A cada ano, abrem-se promissoras frentes de pesquisas dedicadas a identificar a presença de amiloides funcionais em

patógenos e compreender a participação desses agregados nos mecanismos envolvidos durante a interação com o hospedeiro (41, 42).

No presente trabalho, utilizamos diferentes marcadores clássicos para fibras amiloides, através de ensaios morfológicos e ultraestruturais, com o objetivo de identificar estruturas semelhantes aos amiloides em *T. vaginalis*. Além disso, lançamos mão de ensaios funcionais, visando estabelecer uma correlação das estruturas semelhantes aos amiloides com os processos de interação parasito-levedura e parasito-célula hospedeira. Técnicas de bioinformática também foram aplicadas com intuito de: (a) identificar quais proteínas envolvidas no processo de citoaderência de *T. vaginalis* apresentariam potencial para formar amiloides; e (b) estabelecer uma correlação com os resultados dos ensaios morfológicos.

Utilizando ThS e anticorpos anti-amiloides, encontramos marcação positiva para amiloides em estruturas celulares de *T. vaginalis* relacionadas direta (superfície celular e vesículas extracelulares) e indiretamente (complexo de Golgi, corpos multivesiculares e hidrogenossomos) com a interação com o hospedeiro. A maioria destas organelas e estruturas fazem parte da via secretora de *T. vaginalis*. Curiosamente, dentre todos os marcadores testados, o único que não apresentou resultados positivos foi o VC. Similarmente, foi visto que as fibras amiloides da bactéria *Bacillus subtilis* não apresentaram marcação para VC, embora sejam positivos para ThS (43). Outro fator limitante é que a técnica da birrefringência do VC tem baixa sensibilidade para detectar depósitos de fibrilas pequenas (menores que 10 µm de diâmetro) e/ou organizados de maneira pontual e dispersa em amostras de células ou tecidos (44). Desse modo, isso poderia explicar os resultados negativos obtidos por nós com VC.

A marcação para amiloides na superfície de *T. vaginalis* era esperada, visto que é aí que se encontram as moléculas responsáveis pelo contato e adesão do parasito com a célula hospedeira. Além disso, amiloides funcionais em outros microrganismos, como bactérias (20), leveduras (45) e *P. falciparum* (30, 46) são localizados na superfície celular.

Os resultados de bioinformática revelaram que algumas proteínas de superfície de *T. vaginalis* envolvidas na citoaderência possuem alto potencial amiloidogênico. Dentre estas, as adesinas AP51, AP53 e AP65. As adesinas de *T. vaginalis* são descritas como proteínas multifuncionais; embora exista muita controvérsia entre os estudiosos na área sobre isso (47). São primariamente enzimas metabólicas

hidrogenossomais, mas que, por mecanismos ainda desconhecidos, se localizam também na membrana plasmática onde atuam na citoaderência (9, 4). Já é bem estabelecido que determinadas adesinas (*Agglutinin-like sequence*) presentes na superfície de *Candida albicans* e outras leveduras formam amiloides funcionais. Estes amiloides contribuem ativamente para a adesão sobre células e tecidos hospedeiros, bem como para a formação de clusters celulares entre os fungos durante a colonização no hospedeiro (21, 48). Foi visto que existem sequências de formação de amiloides que são encontradas em várias regiões nas diferentes adesinas presentes nos fungos (49). Essas sequências são importantes para a formação de nanodomínios de adesão, formando fortes ligações adesivas entre as células (50, 51). Nossos dados de bioinformática, a marcação positiva para amiloide nos hidrogenossomos e os ensaios de colocalização com o anticorpo anti-enzima málica (AP65) sugerem que as adesinas de *T. vaginalis* poderiam, portanto, formar estruturas similares aos amiloides. Entretanto, estudos estão sendo realizados para determinar se essas proteínas formariam fibras amiloides *in vitro*.

Em nossos resultados *in silico* identificamos também que cisteíno-proteinases leguminaína-like, adesinas BspA-like e a proteína variante de superfície P270 possuem alto potencial amiloidogênico. Sabe-se que essas proteínas desempenham importante papel na citoaderência de *T. vaginalis*, sendo localizadas no Complexo de Golgi, vesículas intracelulares e superfície celular (52-57). Nossos dados sugerem que essas proteínas poderiam ser responsáveis, pelo menos em parte, pela marcação de amiloides encontrada no complexo de Golgi e vesículas intracelulares do parasito. Entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer isso. De todo modo, os resultados sugerem claramente que parte das estruturas semelhantes aos amiloides em *T. vaginalis* seriam processadas no complexo de Golgi antes de serem direcionadas para a superfície do parasito ou secretadas para o meio extracelular.

Dentro desse contexto, encontramos aqui marcação para amiloides em vesículas extracelulares (VEs) secretadas por *T. vaginalis*. Evidências recentes apontam que as VEs (exossomos e microvesículas) estão diretamente associadas com os amiloides funcionais em mamíferos. As VEs regulariam a formação das fibras amiloides funcionais (58, 59). Em *T. vaginalis*, as VEs atuam na interação parasito-hospedeiro e comunicação parasito-parasito (60, 12). Análises proteômicas revelaram que as VEs de *T. vaginalis* contêm diversas proteínas envolvidas diretamente na citoaderência, tais como adesinas, proteínas BspA-like, cisteíno-proteinases, dentre

outras (60, 12). Nossos dados indicam claramente que existe uma relação das VEs com estruturas semelhantes amiloides em *T. vaginalis*. Contudo, estudos estão em andamento para esclarecer o papel das VEs e os amiloides do parasito.

Além das VEs, encontramos também por microscopia eletrônica estruturas fibrilares extracelulares marcadas positivamente para amiloides. Essas fibrilas possuem semelhança morfológica com fibras amiloides típicas (61). Apesar dos anticorpos anti-amiloides serem amplamente empregados para detectar e caracterizar especificamente as fibrilas amiloides nos mais diversos tipos celulares (44, 62, 36), reconhecemos que existe a possibilidade de reação cruzada falso-positiva, como já detectado com os flagelos bacterianos ou outras estruturas não-amiloides ricas em fitas β (36). Além disso, até o presente momento, não sabemos quais são as proteínas que estão sendo reconhecidas pelos anticorpos. Estamos atualmente focados em determinar isso, bem como em isolar as fibrilas extracelulares para investigar sua natureza proteica e possíveis propriedades amiloides

Observamos uma correlação positiva da marcação de estruturas semelhantes aos amiloides na superfície de *T. vaginalis* com as seguintes condições: (a) *clusters* celulares; (b) morfologia ameboide; e (c) após interação com levedura e células hospedeiras. Portanto, os dados sugerem que os amiloides estariam envolvidos, pelo menos em parte, com os eventos celulares supracitados. Já é bem estabelecido que as formas ameboides, os *clusters* celulares e os parasitos aderidos sobre as células-alvo possuem maior expressão de proteínas envolvidas na citoaderência, tais como adesinas, BspA-like, cisteino-proteinases (63, 16, 15).

Existem vários estudos mostrando a importância das fibrilas amiloides na interação dos microrganismos com as células do hospedeiro. As fibras de Curli de *E. coli* são amiloides funcionais que têm importante papel na adesão bactéria-bactéria (64), adesão à superfícies abióticas (65) e adesão ao hospedeiro (66). A adesina ALS3P das leveduras formam amiloides funcionais que participam da coadesão de *C. albicans* à bactéria *S. aureus* (67). Baseados em nossos dados, especulamos que: (1) as proteínas envolvidas na citoaderência de *T. vaginalis* formam amiloides funcionais; e (2) que as superexpressões destas proteínas após a interação com outros microrganismos e células hospedeiras, bem como durante a formação de *clusters*, seriam responsáveis pelo aumento da marcação de amiloides na superfície do parasito. Contudo, serão necessários mais estudos para esclarecer essa especulação.

Dentro desse aspecto, observamos que o marcador ThS foi muito mais sensível em detectar estruturas semelhantes aos amiloides na cepa mais citoaderente de *T. vaginalis* (FMV1). Uma concentração 10x maior de ThS foi necessária para visualizarmos a marcação na cepa menos citoaderente (Jt). Essas cepas já tiveram seus mapas proteômicos comparados, e foi visto que o isolado mais citoaderente possui maior expressão das proteínas envolvidas na citoaderência do que a cepas menos citoaderente (68). Portanto, hipotetizamos que a diferença de marcação para amiloides entre as duas cepas poderia ser devido às diferenças de expressão das proteínas de citoaderência. Além disso, a maior quantidade de estruturas semelhantes aos amiloides na cepa FMV1 poderia contribuir para torná-la mais citoaderente. Entretanto, mais estudos ainda serão realizados para investigar essas questões.

Nossas análises *in silico* também revelaram que as TvTSPs possuem alto potencial amiloidogênico. TvTSPs exercem papel na citoaderência de *T. vaginalis* e estão localizadas em corpos multivesiculares, superfície celular e VEs (10-12), ou seja, em regiões onde encontramos marcação para amiloides. Além disso, a sobreexpressão exógena de TvTSP8 está associada com a formação de *clusters* celulares (11). No presente estudo, nos identificamos uma região amiloidogênica de TvTSP8 e baseado nos resultados de bioinformática construímos um mutante com um menor potencial previsto de agregação amiloide. Nossos resultados mostraram que o número de *clusters* nos parasitos que expressavam a proteína mutante foi reduzido pela metade quando comparado com as *T. vaginalis* que expressavam a proteína selvagem. Este resultado sugere, portanto, que a formação de amiloides em TvTSP8 podem estar relacionados com os *clusters* celulares de *T. vaginalis*. Contudo, mais estudos estão em andamento para esclarecer isso.

5. CONCLUSÕES

Analisados em conjunto, os resultados do presente estudo mostram que, assim como descrito para outros microrganismos, *T. vaginalis* possui estruturas semelhantes aos amiloides funcionais tanto em sua superfície como em organelas envolvidas de alguma forma com o processo de citoaderência. Mostramos que as estruturas amiloides estão relacionadas, pelo menos em parte, com os processos de interação parasito-hospedeiro, parasito levedura, bem como a formação de *clusters* celulares e transformação ameboide de *T. vaginalis*. Os estudos sobre amiloides funcionais em

T. vaginalis poderão contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de citoaderência do parasito, além de estimular novas frentes de pesquisas direcionadas em investigar o papel dos amiloides funcionais em outros microrganismos patogênicos.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz, ao Dr Ronald Wetzel por ter cedido o anticorpo anti-LOC, ao Dr Jan Tachezy por ter cedido o anticorpo anti-PFOR e anti-Málica, a Dra Marlene Benchimol por ter cedido as cepas utilizadas nesse trabalho e a Dra Sheilla Andrade por ter permitido a utilização do seu microscópio de fluorescência.

REFERÊNCIAS

- (1) WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on global sexually transmitted infections surveillance. **Geneva: WHO**, 2018.
- (2) HIRT, R. P.; SHERRARD, J. *Trichomonas vaginalis* origins, molecular pathobiology and clinical considerations. **Current opinion in infectious diseases**, v. 28, n. 1, p. 72-79, 2015.
- (3) SUTCLIFFE, S. et al. Trichomonosis, a common curable STI, and prostate carcinogenesis—a proposed molecular mechanism. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 8, 2012.
- (4) MENEZES, C. B; FRASSON, A. P.; TASCA, T. “Trichomoniasis - are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide?” **Microbial cell**, vol. 3,9, p. 404-419, 2016.
- (5) MERCER, F.; JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis*: Pathogenesis, symbiont interactions, and host cell immune responses. **Trends in parasitology**, v. 34, n. 8, p. 683-693, 2018.
- (6) MIELCZAREK, E.; BLASZKOWSKA, J. *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. **Infection**, v. 44, n. 4, p. 447-458, 2016.
- (7) GHOSH, I. et al. Association between high risk human papillomavirus infection and co-infection with *Candida spp.* and *Trichomonas vaginalis* in women with cervical

pre-malignant and malignant lesions. **Journal of Clinical Virology**, v. 87, p. 43-48, 2017.

(8) BENCHIMOL, M. Trichomonads under microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v.10 p. 528-550, 2004.

(9) MEZA-CERVANTEZ, P. et al. Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. **Microbiology**, v. 157, n. 12, p. 3469-3482, 2011.

(10) DE MIGUEL, N.; Riestra, A.; JOHNSON, P.J. Reversible association of tetraspanin with *Trichomonas vaginalis* flagella upon adherence to host cells. **Cellular microbiology**, v. 14, n. 12, p. 1797-1807, 2012.

(11) COCERES, V. M. et al. The C-terminal tail of tetraspanin proteins regulates their intracellular distribution in the parasite *Trichomonas vaginalis*. **Cellular microbiology**, v. 17, n. 8, p. 1217-1229, 2015.

(12) NIEVAS, Y. R. et al. Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: characterization and their association with cell interaction. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 12, p. 2211-2226, 2018.

(13) GARCIA, A.F.; ALDERETE, J.F. Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. **BMC microbiology**, v. 7, n. 1, p. 116, 2007.

(14) ARDALAN, S.; LEE, B. CRAIG.; GARBER, G.E. *Trichomonas vaginalis*: the adhesins AP51 and AP65 bind heme and hemoglobin. **Experimental parasitology**, v. 121, n. 4, p. 300-306, 2009.

(15) BENCHIMOL, M.; PEREIRA-NEVES, A.; DE SOUZA, W. Pathogenesis of *Trichomonas vaginalis* in Humans. **Human Emerging and Re-emerging Infections: Viral and Parasitic Infections**, v.1, p. 423-439, 2015.

(16) HIRT, R.P. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. **Sexually Transmitted Infections**, v. 89, n. 6, p. 439-443, 2013.

(17) CHITI, F.; DOBSON, C. M. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 27-68, 2017.

(18) BEMPORAD, F.; RAMAZZOTTI, M. From the evolution of protein sequences able to resist self-assembly to the prediction of aggregation propensity. In: **International review of cell and molecular biology**. Academic Press, v. 329, p. 1-47, 2017.

(19) PHAM, C. L. L, et al. Functional amyloid: widespread in Nature, diverse in purpose. **Essays in biochemistry**, v. 56, p. 207-219, 2014.

- (20) JAIN, N.; CHAPMAN, M. R. Bacterial functional amyloids: Order from disorder. **Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics**, v.1867, p.954-960, 2019.
- (21) GILCHRIST, K.B. et al. New features of invasive candidiasis in humans: amyloid formation by fungi and deposition of serum amyloid P component by the host. **The Journal of infectious diseases**, v. 206, n. 9, p. 1473-1478, 2012.
- (22) JACOB, R.S. et al. Cell adhesion on amyloid fibrils lacking integrin recognition motif. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 10, p. 5278-5298, 2016.
- (23) WATT, B.; NIEL, G.; RAPOSO, G.; MARKS, M.S. PMEL: a pigment cell-specific model for functional amyloid formation. **Pigment cell & melanoma research**, v. 26, n. 3, p. 300-315, 2013.
- (24) CALAMAI, M. et al. Nature and significance of the interactions between amyloid fibrils and biological polyelectrolytes. **Biochemistry**, v. 45, n. 42, p. 12806-12815, 2006.
- (25) GHOSH, D. et al. Complexation of amyloid fibrils with charged conjugated polymers. **Langmuir**, v. 30, n. 13, p. 3775-3786, 2014.
- (26) MUNCH, J. et al. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1059-1071, 2007.
- (27) SCHWARTZ, K.; BOLES, B.R. Microbial amyloids—functions and interactions within the host. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 1, p. 93-99, 2013.
- (28) ROMERO, D.; KOLTER, R. Functional amyloids in bacteria. **International Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 65-73, 2014.
- (29) CHAN, C. X. J; LIPKE, P. N. Role of force-sensitive amyloid-like interactions in fungal catch bonding and biofilms. **Eukaryotic cell**, v. 13, n. 9, p. 1136-1142, 2014.
- (30) ADDA, C. G. et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is unstructured and forms amyloid-like fibrils. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 166, n. 2, p. 159-171, 2009.
- (31) JESUS, J. B. et al. *Trichomonas vaginalis* virulence against epithelial cells and morphological variability: the comparison between a well-established strain and a fresh isolate. **Parasitology Research**, v. 93, n. 5, p. 369-377, 2004.
- (32) DIAMOND, L.S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **The Journal of parasitology**, v. 43, n. 4, p. 488-490, 1957.
- (33) DE MIGUEL, N. et al. Proteome analysis of the surface of *Trichomonas vaginalis* reveals novel proteins and strain-dependent differential expression. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, n. 7, p. 1554-1566, 2010.

- (34) CONCHILLO-SOLÉ, O. et al. AGGREGSCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. **BMC bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 65, 2007.
- (35) VASSAR, P. S.; CULLING, C. F. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. **Archives of pathology**, v. 68, p. 487-498, 1959.
- (36) ERSKINE, E.; MACPHEE, C. E.; STANLEY-WALL, N. R. Functional amyloid and other protein fibers in the biofilm matrix. **Journal of molecular biology**, v. 430, n. 20, p. 3642-3656, 2018.
- (37) STAIRS, C. W.; LEGER, M. M.; ROGER, A. J. Diversity and origins of anaerobic metabolism in mitochondria and related organelles. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1678, p. 20140326, 2015.
- (38) FERNANDES, L. et al. An ortho-Iminoquinone Compound Reacts with Lysine Inhibiting Aggregation while Remodeling Mature Amyloid Fibrils. **ACS chemical neuroscience**, v. 8, n. 8, p. 1704-1712, 2017.
- (39) PEREIRA-NEVES, A.; BENCHIMOL, M. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. **Biology of the Cell**, v. 99, n. 2, p. 87-101, 2007.
- (40) ARSLAN, F. et al. Heterologous aggregates promote de novo prion appearance via more than one mechanism. **PLoS genetics**, v. 11, n. 1, 2015.
- (41) OTZEN, D.; RIEK, R. Functional amyloids. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 12, p. a033860, 2019.
- (42) SHANMUGAM, N. et al. Microbial functional amyloids serve diverse purposes for structure, adhesion and defence. **Biophysical reviews**, p. 1-16, 2019.
- (43) ROMERO, D. et al. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 5, p. 2230-2234, 2010.
- (44) O'NUALLAIN, B.; WETZEL, R. Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1485-1490, 2002.
- (45) HO, V. et al. An Amyloid Core Sequence in the Major *Candida albicans* Adhesin Als1p Mediates Cell-Cell Adhesion. **mBio**, v. 10, n. 5, p. e01766-19, 2019.
- (46) MOLES, E. et al. Possible roles of amyloids in malaria pathophysiology. **Future science OA**, v. 1, n. 2, 2015.
- (47) RADA, P. et al. Investigation of the Secretory Pathway in *Trichomonas vaginalis* Argues against a Moonlighting Function of Hydrogenosomal Enzymes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 899-910, 2019.

- (48) GARCIA-SHERMAN, M.C. et al. Peptide detection of fungal functional amyloids in infected tissue. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e86067, 2014.
- (49) LIPKE, P. N. et al. Strengthening relationships: amyloids create adhesion nanodomains in yeasts. **Trends in microbiology**, v. 20, n. 2, p. 59-65, 2012.
- (50) RAMSOOK, C. B. et al. Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 3, p. 393-404, 2010.
- (51) GARCIA, M.C. et al. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17632, 2011.
- (52) GARCIA, A. F.; BENCHIMOL, M.; ALDERETE, J. F. *Trichomonas vaginalis* polyamine metabolism is linked to host cell adherence and cytotoxicity. **Infection and immunity**, v. 73, n. 5, p. 2602-2610, 2005.
- (53) NOËL, C. J. et al. *Trichomonas vaginalis* vast BspA-like gene family: evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 99, 2010.
- (54) RENDÓN-GANDARILLA, F. J. et al. The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- (55) HANDRICH, M. R. et al. Characterization of the BspA and Pmp protein family of trichomonads. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2019.
- (56) ALDERETE, J. F. Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. **Infection and immunity**, v. 67, n. 8, p. 4298-4302, 1999.
- (57) GARCIA, A. F. et al. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. **Molecular microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1207-1224, 2003.
- (58) VAN NIEL, G. Study of exosomes shed new light on physiology of amyloidogenesis. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 36, n. 3, p. 327-342, 2016.
- (59) WHELLY, S. et al. Cystatin-related epididymal spermatogenic subgroup members are part of an amyloid matrix and associated with extracellular vesicles in the mouse epididymal lumen. **Mhr: Basic science of reproductive medicine**, v. 22, n. 11, p. 729-744, 2016.
- (60) TWU, O. et al. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host: parasite interactions. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 7, 2013.
- (61) CAO, Y.; MEZZENGA, R. Food protein amyloid fibrils: Origin, structure, formation, characterization, applications and health implications. **Advances in colloid and interface science**, v. 269, p. 334-356, 2019.

- (62) KAYED, R. et al. Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. **Molecular neurodegeneration**, v. 2, n. 1, p. 18, 2007.
- (63) HUANG, K.Y.; HUANG, P.J.; KU, F.M.; LIN, R.; ALDERETE, J.F.; TANG, P. Comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Trichomonas vaginalis* following adherence to fibronectin. **Infection and immunity**, v. 80, n. 11, p. 3900-3911, 2012.
- (64) VAN HOUTT, R.; MICHELIS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Research in microbiology**, v. 156, n. 5-6, p. 626-633, 2005.
- (65) DEBENEDICTIS, E. P.; LIU, J.; KETEN, S. Adhesion mechanisms of curli subunit CsgA to abiotic surfaces. **Science advances**, v. 2, n. 11, p. e1600998, 2016.
- (66) TÜKEL, Ç. et al. Responses to amyloids of microbial and host origin are mediated through toll-like receptor 2. **Cell host & microbe**, v. 6, n. 1, p. 45-53, 2009.
- (67) PETERS, B. M. et al. *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 12, p. 2975, 2012.
- (68) CUERVO, P. et al. Differential soluble protein expression between *Trichomonas vaginalis* isolates exhibiting low and high virulence phenotypes. **Journal of Proteomics**, v. 71, n. 1, p. 109-122, 2008.

(MATERIAL SUPLEMENTAR)

Tabela 1. Análise preliminar do potencial amiloidogênico de 510 proteínas conhecida encontradas na superfície de *T. vaginalis* utilizando o programa AGGRESCAN. As proteínas foram ranqueadas em ordem decrescente de propensão geral de agregação amiloide de acordo com o parâmetro Na4vSS.

Gene name	Sorted by Na4vSS	Protein name
TVAG_284770	48.0	Adenylate and Guanylate cyclase catalytic domain
TVAG_252610	46.9	Transmembrane amino acid transporter protein
TVAG_099180	38.4	LMBR1-like conserved region family protein
TVAG_136250	34.8	V-type ATPase, C subunit family protein
TVAG_034240	32.4	ctl transporter, putative
TVAG_365660	32.2	ctl transporter, putative
TVAG_019180	31.9	Tetraspanin family protein
TVAG_271570	30.3	Nucleoside transporter family protein
TVAG_478850	30.0	Na ⁺ driven multidrug efflux pump, putative
TVAG_094600	29.4	regulator of G protein
TVAG_065750	28.0	Major Facilitator Superfamily protein
TVAG_239840	27.9	Major Facilitator Superfamily protein
TVAG_419700	27.0	Sodium:sulfate symporter transmembrane region
TVAG_053320	26.0	Nucleoside transporter family protein
TVAG_237280	25.6	ctl transporter, putative
TVAG_412640	23.2	hypothetical protein
Gene name	Sorted by Na4vSS	Protein name
TVAG_140970	22.5	ctl transporter, putative
TVAG_092170	22.1	preprotein translocase, SecY subunit
TVAG_379430	20.7	hypothetical protein
TVAG_301870	20.6	Ser/Thr protein phosphatase family protein
TVAG_019180	20.1	Tetraspanin 1
TVAG_498900	20.0	hypothetical protein
TVAG_399430	19.2	hypothetical protein
TVAG_186390	19.1	Adenylate and Guanylate cyclase catalytic domain
TVAG_127290	18.2	hypothetical protein
TVAG_384150	17.9	hypothetical protein
TVAG_005750	17.4	ctl transporter, putative
TVAG_013660	17.0	Clan CA, family C2, calpain-like cysteine peptidase
TVAG_131910	16.7	surface antigen BspA-like
TVAG_185900	16.1	hypothetical protein
TVAG_185680	16.1	hypothetical protein
TVAG_411910	15.6	Auxin Efflux Carrier family protein
TVAG_045530	14.9	ABC transporter family protein
TVAG_087670	14.8	Ser/Thr protein phosphatase family protein
TVAG_237680	14.4	hydrogenosomal membrane protein 31 precursor
TVAG_240680	14.2	Surface antigen BspA-like
TVAG_461030	14.1	ABC transporter family protein
TVAG_453790	13.5	Putative uncharacterized protein
TVAG_126560	13.5	hypothetical protein
TVAG_041860	13.4	hypothetical protein
TVAG_440200	12.8	hypothetical protein
TVAG_122850	12.5	hypothetical protein
TVAG_275520	12.5	hypothetical protein
TVAG_453790	12.3	hypothetical protein
TVAG_240680	11.9	Surface antigen BspA-like

TVAG_230400	11.9	hypothetical protein
TVAG_302910	11.6	Adenylate and Guanylate cyclase catalytic domain
TVAG_149320	11.6	hypothetical protein
TVAG_178030	11.4	calcium-translocating P-type ATPase, PMCA-type
TVAG_075320	11.3	V-type ATPase 116kDa subunit family protein
TVAG_190330	11.1	ABC transporter family protein
TVAG_140990	11.0	hypothetical protein
TVAG_268070	10.9	surface antigen BspA-like
TVAG_109130	10.6	Clan SB, family S8, subtilisin-like serine peptidase
TVAG_004670	10.6	hypothetical protein
TVAG_461020	10.3	ABC transporter family protein
TVAG_166630	10.1	hypothetical protein
TVAG_190320	10.0	ABC transporter family protein
TVAG_221760	10.0	hypothetical protein
TVAG_498560	9.8	secretory carrier membrane protein, putative
TVAG_483410	9.6	hypothetical protein
TVAG_487580	9.6	hypothetical protein
TVAG_173930	9.5	hypothetical protein
TVAG_136510	9.5	hypothetical protein
TVAG_277590	9.5	Calcium-translocating P-type ATPase
TVAG_104680	9.3	hypothetical protein
TVAG_391590	9.1	XYPPX repeat family protein
TVAG_017960	9.1	hypothetical protein
TVAG_417590	8.9	hypothetical protein
TVAG_213240	8.9	hypothetical protein
TVAG_142720	8.8	Subtilase family protein
TVAG_416580	8.7	hypothetical protein
TVAG_157210	8.5	hypothetical protein
TVAG_123490	8.5	hypothetical protein
Gene name	Sorted by Na4vSS	Protein name
TVAG_134230	8.3	hypothetical protein
TVAG_573900	8.3	hypothetical protein
TVAG_208990	8.3	Profilin A
TVAG_157210	8.3	Putative uncharacterized protein
TVAG_108920	8.2	hypothetical protein
TVAG_315940	8.1	hypothetical protein
TVAG_154640	7.9	surface antigen BspA-like
TVAG_038550	7.6	hypothetical protein
TVAG_405960	7.6	hypothetical protein
TVAG_185520	7.5	hypothetical protein
TVAG_365230	7.1	Adenylate and Guanylate cyclase catalytic domain
TVAG_030540	7.0	hypothetical protein
TVAG_388330	6.9	cation-transporting ATPase, putative
TVAG_444510	6.8	adenosine diphosphatase, putative
TVAG_148100	6.8	hypothetical protein
TVAG_152020	6.6	hypothetical protein
TVAG_140290	6.6	Ribosomal L27e protein family protein
TVAG_122750	6.5	hypothetical protein
TVAG_491670	6.5	Malic enzyme
TVAG_157450	6.4	hypothetical protein
TVAG_055030	6.4	hypothetical protein
TVAG_456510	6.3	nucleoside phosphatase family protein
TVAG_099730	6.3	hypothetical protein
TVAG_426230	6.3	hypothetical protein
TVAG_337370	6.3	hypothetical protein
TVAG_108330	6.1	hypothetical protein
TVAG_258230	6.0	Putative uncharacterized protein
TVAG_098440	5.9	class I nuclease-related

TVAG_244140	5.9	hypothetical protein
TVAG_006020	5.9	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 38kDa
TVAG_193800	5.8	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
TVAG_178740	5.4	hypothetical protein
TVAG_525700	5.2	hypothetical protein
TVAG_212820	5.2	AMP-binding enzyme family protein
TVAG_243960	5.1	hypothetical protein
TVAG_348230	5.1	hypothetical protein
TVAG_186170	5.0	hypothetical protein
TVAG_037100	4.8	Synaptobrevin family protein
TVAG_213670	4.8	hypothetical protein
TVAG_443430	4.7	hypothetical protein
TVAG_291380	4.7	Putative uncharacterized protein
TVAG_099730	4.3	Putative uncharacterized protein
TVAG_547230	4.1	Adaptin N terminal region family protein
TVAG_228780	4.1	alcohol dehydrogenase 1, putative
TVAG_110300	4.0	hypothetical protein
TVAG_367420	4.0	Putative uncharacterized protein
AAQ930391	3.9	Legumain-like cysteine protein
TVAG_397320	3.9	hypothetical protein
TVAG_412550	3.9	hypothetical protein
TVAG_456780	3.7	hypothetical protein
TVAG_454490	3.4	Purine nucleoside phosphorylase
TVAG_492250	3.4	profilin A-related
TVAG_133500	3.3	surface immunogen P270-related
TVAG_390980	3.3	GP63-like
TVAG_191500	3.3	GP63-like
TVAG_036010	3.0	Hydrogenosomal oxygen reductase, identical
TVAG_159160	3.0	Profilin
TVAG_369130	2.9	hypothetical protein
Gene name	Sorted by Na4vSS	Protein name
TVAG_300690	2.9	hypothetical protein
TVAG_293770	2.9	Phosphofructokinase family protein
TVAG_224040	2.9	phosphoserine aminotransferase
TVAG_099570	2.9	phosphoserine aminotransferase
TVAG_239650	2.8	hypothetical protein
TVAG_164030	2.8	hypothetical protein
TVAG_583060	2.7	40S ribosomal protein S4-C, putative
TVAG_268020	2.7	aspartate aminotransferase
TVAG_183300	2.6	aminotransferase class V
TVAG_462920	2.6	Phosphofructokinase family protein
TVAG_283620	2.4	hypothetical protein
TVAG_364050	2.3	syntaxin binding protein-1,2,3,
TVAG_100620	2.2	Profilin A.-related
TVAG_247370	2.2	hypothetical protein
TVAG_358240	2.2	hypothetical protein
TVAG_508080	2.2	acid phosphatase, putative
TVAG_434360	2.1	hypothetical protein
TVAG_267320	1.9	Nicastrin precursor, putative
TVAG_020780	1.9	Ser/Thr protein phosphatase family protein
TVAG_229200	1.9	hypothetical protein
TVAG_273970	1.9	hypothetical protein
TVAG_154750	1.9	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
TVAG_090470	1.8	Actin
TVAG_271580	1.8	Ser/Thr protein phosphatase family protein
TVAG_233140	1.8	Rhomboid family protein
TVAG_056190	1.7	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase
TVAG_337240	1.6	Actin

TVAG_054030	1.6	actin, identical
TVAG_477050	1.4	Synaptobrevin family protein
TVAG_354020	1.4	centractin
TVAG_354040	1.4	centractin
TVAG_088220	1.3	aminotransferase, classes I and II family protein
TVAG_429290	1.2	glycine-rich protein Rv2126c-related
TVAG_321740	1.2	hypothetical protein
TVAG_422780	0.9	alcohol dehydrogenase
TVAG_571140	0.8	hypothetical protein
TVAG_216170	0.7	hypothetical protein
TVAG_019370	0.7	hypothetical protein
TVAG_114310	0.6	thioredoxin peroxidase, identical
TVAG_144730	0.6	adhesin protein AP51-2, putative
TVAG_081630	0.5	purine nucleoside phosphorylase
TVAG_110660	0.5	beta-hexosaminidase, putative
TVAG_212020	0.5	transketolase family protein
TVAG_283640	0.5	hypothetical protein
TVAG_259190	0.4	Succinyl-CoA ligase beta-chain
TVAG_183500	0.4	Adhesin protein AP51-3, putative
TVAG_224190	0.3	hypothetical protein
TVAG_434970	0.3	Actin
TVAG_318670	0.3	succinate thiokinase a subunit
TVAG_146910	0.3	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative
AAC483391	0.2	AP33 adhesin
TVAG_239650	0.20	conserved hypothetical protein
TVAG_165340	0.20	succinate thiokinase a subunit
TVAG_096350	0.20	triosephosphate isomerase
TVAG_086980	0.2	hypothetical protein
TVAG_227260	0.2	hypothetical protein
TVAG_172140	0.1	ABC transporter family protein
TVAG_379760	0.1	Subtilase family protein
Gene name	Sorted by Na4vSS	Protein name
TVAG_152680	0.1	Chlamydial polymorphic outer membrane protein
TVAG_197820	0.00	translation initiation inhibitor
TVAG_527585	0.00	surface immunogen P270-related
TVAG_477640	-0.20	hypothetical protein
TVAG_457600	-0.20	neutral alpha-glucosidase ab precursor
TVAG_180840	-0.30	translationally controlled tumor protein
TVAG_074480	-0.30	ribosomal protein L10a, identical
TVAG_393400	-0.30	hypothetical protein
TVAG_465250	-0.50	Subtilase family protein
TVAG_402240	-0.60	Histidine acid phosphatase family protein
TVAG_204360	-0.60	malate dehydrogenase
TVAG_590550	-0.60	hydrogenosomal membrane protein Hmp35
TVAG_147050	-0.70	hypothetical protein
TVAG_003700	-0.70	Subtilase family protein
TVAG_412220	-0.80	malate dehydrogenase:SUBUNIT=A, putative
TVAG_369290	-0.90	GP63-like
TVAG_369300	-0.90	GP63-like
TVAG_391100	-0.90	GP63-like
TVAG_249080	-0.90	snare proteins
TVAG_420260	-1.00	ATP synthase beta subunit
TVAG_047890	-1.00	succinate thiokinase a subunit
TVAG_435830	-1.00	hypothetical protein
TVAG_126970	-1.10	RAB GDP-dissociation inhibitor
TVAG_276410	-1.10	translation elongation factor
TVAG_380910	-1.10	eukaryotic translation initiation factor, putative
TVAG_249080	-1.20	Synaptobrevin family protein

TVAG_035410	-1.20	translation initiation inhibitor
TVAG_087140	-1.30	arp2/3
TVAG_420260	-1.30	ATP synthase beta subunit, putative
TVAG_369020	-1.30	clathrin heavy chain, putative
TVAG_238830	-1.40	malate dehydrogenase:SUBUNIT=B, identical
TVAG_246840	-1.40	hypothetical protein
TVAG_290120	-1.40	hypothetical protein
TVAG_400860	-1.50	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase
TVAG_209020	-1.50	phosphoglycerate mutase
TVAG_206500	-1.50	Hydroxylamine reductase, putative
TVAG_391760	-1.50	Phosphofructokinase family protein
TVAG_340290	-1.50	adhesin AP65-1 precursor, identical
TVAG_015800	-1.60	60S ribosomal protein L23, putative
TVAG_224030	-1.60	hypothetical protein
TVAG_371040	-1.70	Clan ME, family M16, insulinase-like metallopeptidase
TVAG_395550	-1.70	Acetyl-CoA hydrolase, putative
TVAG_383940	-1.80	phosphoglycerate kinase
TVAG_475220	-1.80	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
TVAG_113870	-1.80	Acetyl-CoA hydrolase, putative
TVAG_224980	-2.00	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase
TVAG_054830	-2.00	phosphoglucomutase
TVAG_265780	-2.00	hypothetical protein
TVAG_430830	-2.10	phosphofructokinase
TVAG_164890	-2.10	Acetyl-CoA hydrolase, putative
TVAG_276410	-2.10	translation elongation factor, putative
TVAG_218820	-2.20	histidine acid phosphatase
TVAG_347410	-2.20	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
TVAG_412780	-2.20	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
TVAG_240050	-2.20	40S ribosomal protein sa, putative
TVAG_448390	-2.20	alpha-tubulin 1, putative
TVAG_196270	-2.20	alpha-tubulin 1, putative
TVAG_268050	-2.30	phosphoglycerate kinase
Gene name	Sorted by Na4vSS	Protein name
TVAG_043070	-2.30	fructose-bisphosphate aldolase
TVAG_293660	-2.30	Bap-like
TVAG_345870	-2.40	hypothetical protein
TVAG_159500	-2.40	hypothetical protein
TVAG_340570	-2.40	conserved hypothetical protein
TVAG_046150	-2.50	hypothetical protein, putative ALG2 interacting protein
TVAG_333620	-2.50	WD-repeat protein
TVAG_366380	-2.50	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
TVAG_146910	-2.50	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
TVAG_272360	-2.60	Rac1-related protein, identical
TVAG_383940	-2.60	Phosphoglycerate kinase, putative
TVAG_218800	-2.60	Histidine acid phosphatase family protein
TVAG_203300	-2.60	hypothetical protein
TVAG_032440	-2.60	GP63-like
TVAG_547420	-2.70	hypothetical protein
TVAG_299640	-2.70	Chlamydial polymorphic outer membrane protein
TVAG_476020	-2.80	vesicular-fusion protein nsf
TVAG_336320	-2.90	hydroxylamine reductase, putative
TVAG_468240	-3.00	dihydropyrimidine dehydrogenase
TVAG_212740	-3.00	phosphoglycerate mutase
TVAG_482670	-3.00	Subtilase family protein
TVAG_371880	-3.10	actin
TVAG_405240	-3.20	adenosylhomocysteinase
TVAG_061930	-3.20	glucose-6-phosphate isomerase
TVAG_205910	-3.20	phosphoglucomutase

TVAG_268050	-3.20	Phosphoglycerate kinase, putative
TVAG_464170	-3.20	enolase 4, putative
TVAG_351310	-3.30	plastin
TVAG_253650	-3.30	malate dehydrogenase
TVAG_351310	-3.30	fimbrin, putative
TVAG_113710	-3.40	phosphoglycerate mutase
TVAG_088050	-3.40	chaperonin 60, putative
TVAG_335250	-3.40	hypothetical protein
TVAG_393390	-3.40	hypothetical protein
TVAG_212570	-3.40	Chlamydial polymorphic outer membrane protein
TVAG_456920	-3.50	tubulin alpha chain
TVAG_151830	-3.50	dihydroorotate dehydrogenase
TVAG_338230	-3.50	dihydroorotate dehydrogenase
TVAG_147790	-3.80	methionine gamma-lyase, identical
TVAG_071920	-3.80	40S ribosomal protein S23, putative
TVAG_256100	-3.80	hypothetical protein
TVAG_498650	-3.80	hypothetical protein
TVAG_341380	-3.90	nucleoside diphosphate kinase
TVAG_261590	-3.90	f-actin capping protein beta subunit
TVAG_064330	-3.90	GP63-like
TVAG_307990	-4.00	hypothetical protein
TVAG_301380	-4.10	GTP-binding protein alpha subunit, gna
TVAG_329460	-4.10	enolase
TVAG_164550	-4.10	60S ribosomal protein L4
TVAG_128790	-4.10	60S ribosomal protein L4
TVAG_189110	-4.10	60S ribosomal protein L4
TVAG_037570	-4.10	64kDa iron hydrogenase, putative
TVAG_348330	-4.20	glycogen phosphorylase, identical
TVAG_293370	-4.30	nucleoside diphosphate kinase
TVAG_157940	-4.40	conserved hypothetical protein
TVAG_463940	-4.40	translation factor
TVAG_067400	-4.40	elongation factor 1-alpha
TVAG_157940	-4.40	4-alpha-glucanotransferase family protein
Gene name	Sorted by Na4vSS	Protein name
TVAG_329460	-4.40	enolase 2, putative
TVAG_182370	-4.50	chaperonin containing t-complex protein 1, gamma subunit, tcpg
TVAG_080000	-4.50	Glycosyl hydrolase family 14 protein
TVAG_008680	-4.70	tubulin epsilon chain
TVAG_062880	-4.70	tubulin
TVAG_398430	-4.70	C2 domain containing protein
TVAG_054130	-4.70	60S ribosomal protein L7-2, putative
TVAG_398480	-4.80	chaperonin-60kD, ch60
TVAG_203620	-5.00	chaperonin 60, putative
TVAG_217740	-5.00	hypothetical protein
TVAG_420390	-5.10	phosphoenolpyruvate carboxykinase
TVAG_462480	-5.10	Rac1-related protein, putative
TVAG_424960	-5.10	hypothetical protein
TVAG_091430	-5.10	hypothetical protein
TVAG_094060	-5.20	f-actin capping protein beta subunit
TVAG_198680	-5.20	40S ribosomal protein S7.-related
TVAG_106650	-5.40	GP63-like
TVAG_345130	-5.40	surface immunogen P270-related
TVAG_139300	-5.40	phosphoenolpyruvate carboxykinase
TVAG_154680	-5.40	4-alpha-glucanotransferase family protein
TVAG_177320	-5.50	hypothetical protein
TVAG_351790	-5.50	hypothetical protein
TVAG_310250	-5.50	phosphoenolpyruvate carboxykinase
TVAG_140850	-5.60	Chlamydial polymorphic outer membrane protein

TVAG_367130	-5.60	GP63-like
TVAG_197690	-5.60	GTPase_rho
TVAG_300000	-5.70	fructose-bisphosphate aldolase
TVAG_061070	-5.70	hypothetical protein
TVAG_342580	-5.70	hypothetical protein
TVAG_494220	-5.70	hypothetical protein
TVAG_043500	-5.80	enolase 3, putative
TVAG_047990	-5.80	glutaminyl-tRNA synthetase
TVAG_137880	-5.80	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, ppia
TVAG_282070	-5.90	Rab8
TVAG_218790	-5.90	conserved hypothetical protein
TVAG_260750	-5.90	hypothetical protein
TVAG_436700	-5.90	Glycosyl hydrolase family 14 protein
TVAG_479540	-6.00	phosphoenolpyruvate carboxykinase
TVAG_360700	-6.00	fructose-bisphosphate aldolase
TVAG_528820	-6.00	Chlamydial polymorphic outer membrane protein
TVAG_400860	-6.00	GP63-like
TVAG_000880	-6.10	GP63-like
TVAG_067440	-6.20	conserved hypothetical protein
TVAG_178890	-6.20	chaperonin
TVAG_177930	-6.20	chaperonin-60kD, ch60
TVAG_045320	-6.30	hypothetical protein
TVAG_046340	-6.30	hypothetical protein
TVAG_219770	-6.30	Macrophage mirgation inhibitory factor-like
TVAG_470230	-6.40	F actin capping protein subunit alpha
TVAG_402580	-6.40	ribonucleoside-diphosphate reductase alpha chain
TVAG_379850	-6.50	Rab32, putative
TVAG_428180	-6.50	hypothetical protein
TVAG_274750	-6.60	GTP-binding protein alpha subunit, gna
TVAG_073860	-6.60	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase
TVAG_043060	-6.60	fructose-bisphosphate aldolase
TVAG_154880	-6.70	hypothetical protein
TVAG_159730	-6.70	Rab78
TVAG_474980	-6.70	dihydrolipoamide dehydrogenase
Gene name	Sorted by Na4vSS	Protein name
TVAG_106800	-6.90	Ribosomal protein S3
TVAG_577920	-7.00	surface immunogen P270-related
TVAG_329350	-7.00	Rab5
TVAG_473170	-7.00	calcium binding protein
TVAG_169070	-7.10	acid phosphatase
TVAG_280090	-7.10	hypothetical protein
TVAG_190510	-7.20	small GTP-binding protein
TVAG_083260	-7.20	ribosomal protein L22 containing protein
TVAG_193980	-7.20	surface immunogen P270-related
TVAG_178140	-7.30	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase
TVAG_169060	-7.40	GTPase_rho
TVAG_347250	-7.40	60S ribosomal protein L18a
TVAG_180840	-7.60	Translationally controlled tumour protein
TVAG_192620	-7.60	Cofilin/tropomyosin-type actin-binding protein
TVAG_033410	-7.60	hypothetical protein
TVAG_074610	-7.70	60S ribosomal protein L10, putative
TVAG_119330	-7.80	Ribosomal protein L21e containing protein
TVAG_194330	-7.80	GP63-like
TVAG_436740	-7.80	conserved hypothetical protein
TVAG_122240	-7.90	GP63-like
TVAG_470240	-8.00	F actin capping protein subunit alpha
TVAG_452120	-8.10	GTP-binding protein alpha subunit, gna
TVAG_358110	-8.20	enolase

TVAG_169740	-8.30	RAB 19, 41
TVAG_509310	-8.40	hypothetical protein
TVAG_190730	-8.40	surface immunogen P270-related
TVAG_010520	-8.70	lim domain
TVAG_418970	-8.70	thioredoxin m(mitochondrial)-type
TVAG_462940	-8.80	14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha
TVAG_249040	-8.80	conserved hypothetical protein
TVAG_416010	-8.80	60S ribosomal protein L18a
TVAG_198430	-9.00	14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha
TVAG_244130	-9.10	hypothetical protein
TVAG_453110	-9.20	ATP synthase alpha subunit mitochondrial
TVAG_324980	-9.20	ATP synthase
TVAG_318870	-9.30	spermatogenesis associated factor, putative
TVAG_293080	-9.30	GP63-like
TVAG_303180	-9.30	heat shock protein 70 (HSP70)-4
TVAG_166850	-9.50	hypothetical protein
TVAG_430040	-9.60	hypothetical protein
TVAG_124870	-9.60	WD-repeat protein
TVAG_572140	-9.70	rho5 protein
TVAG_174520	-9.70	SNF7 family protein
TVAG_070500	-9.70	Rab7g protein
TVAG_072120	-9.90	C2 domain containing protein
TVAG_083140	-9.90	SED4, putative
TVAG_408160	-9.90	ral (Ras related protein)
TVAG_222320	-10.00	WD-repeat protein
TVAG_350520	-10.20	conserved hypothetical protein
TVAG_237140	-10.3	mitochondrial-type HSP70, putative
TVAG_202040	-10.40	GTPase_rho
TVAG_148950	-10.6	60S ribosomal protein L15-1, putative
TVAG_340390	-10.6	mitochondrial-type HSP70, putative
TVAG_494490	-10.8	GP63-like
TVAG_365870	-10.90	conserved hypothetical protein
TVAG_196620	-10.90	conserved hypothetical protein
TVAG_498870	-10.9	hypothetical protein
TVAG_454380	-11.00	14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha
Gene name	Sorted by Na4vSS	Protein name
TVAG_305580	-11.10	hypothetical protein
TVAG_519070	-11.2	hypothetical protein
TVAG_436360	-11.2	surface immunogen P270-related
TVAG_353480	-11.40	conserved hypothetical protein
TVAG_271840	-11.50	f-actin capping protein beta subunit
TVAG_251260	-11.90	14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha
TVAG_305400	-12.00	seryl-tRNA synthetase
TVAG_026730	-12.10	microsomal stress 70 protein ATPase core precursor
TVAG_487600	-12.20	enolase
TVAG_394040	-12.20	heat shock protein 70kD
TVAG_350580	-12.40	Rab21
TVAG_467910	-12.4	Vesicle transport v-SNARE protein
TVAG_161630	-12.5	hypothetical protein
TVAG_405170	-12.80	twintilin
TVAG_580280	-12.8	Rab6, putative
TVAG_377740	-12.8	hypothetical protein
TVAG_013060	-13.0	60S ribosomal protein L3, putative
TVAG_206300	-13.30	40S ribosomal protein S8
TVAG_164160	-13.30	40S ribosomal protein S8
TVAG_066030	-13.30	40S ribosomal protein S8
TVAG_435430	-13.30	40S ribosomal protein S8
TVAG_064640	-13.3	ribosomal protein L5, identical

TVAG_156680	-13.40	vab10 spectraplaklin
TVAG_371800	-13.40	GP63-like
TVAG_051820	-13.5	Mitochondrial carrier protein
TVAG_190450	-13.70	alpha-actinin, putative
TVAG_239310	-13.80	bolus pemphigoid antigen (similar to alpha-actinin)
TVAG_161100	-13.80	heat shock protein 70kD
TVAG_184320	-13.80	heat shock protein
TVAG_389550	-13.90	GTP-binding protein (q) alpha-11 subunit, gna11
TVAG_163000	-13.90	heat shock protein
TVAG_518970	-14.0	hypothetical protein
TVAG_192620	-14.10	actin depolymerizing factor
TVAG_121530	-14.20	conserved hypothetical protein
TVAG_151220	-14.20	heat shock protein 70 (HSP70)-4
TVAG_153560	-14.20	heat shock protein, putative
TVAG_044510	-14.40	cytoplasmic heat shock protein 70, putative
TVAG_383350	-14.80	RAB-2,4,14
TVAG_070550	-14.90	syntaxin
TVAG_273950	-15.0	ankyrin repeat-containing protein, putative
TVAG_171670	-15.30	heat shock protein
TVAG_212270	-15.40	F-actin capping protein subunit alpha
TVAG_185830	-15.40	skd/vacuolar sorting
TVAG_576970	-15.50	lipid binding protein (Giardia)
TVAG_118780	-15.70	calmodulin
TVAG_351500	-15.70	Rab7, putative
TVAG_453150	-15.80	GTP-binding protein alpha subunit, gna
TVAG_411130	-15.8	hypothetical protein
TVAG_505960	-16.4	surface immunogen P270-related
TVAG_066030	-16.9	ribosomal protein S18, identical
TVAG_036210	-17.00	nascent polypeptide associated complex alpha subunit
TVAG_286460	-17.10	Rab1
TVAG_172060	-17.70	conserved hypothetical protein, SMC domain
TVAG_044270	-18.00	RAB
TVAG_010560	-18.9	30S 40S ribosomal protein, putative
TVAG_092490	-19.4	endoplasmic reticulum heat shock protein 70
TVAG_167790	-20.1	hypothetical protein
TVAG_222450	-20.80	small GTP-binding protein
TVAG_261950	-21.40	conserved hypothetical protein, QXW lectin repeat family
TVAG_295200	-21.7	HMG box family protein
TVAG_176230	-21.90	soluble nsf attachment protein
TVAG_446910	-22.0	Novel plant SNARE, putative
TVAG_151500	-22.60	chmp1
TVAG_034660	-23.4	60S ribosomal protein L44, putative
TVAG_019240	-24.0	polyubiquitin, putative
TVAG_396200	-24.10	SNF7 family protein
TVAG_110710	-24.1	DNA double-strand break repair Rad50 ATPase
TVAG_464010	-24.3	Calreticulin family protein
TVAG_306370	-25.3	hypothetical protein
TVAG_084340	-25.4	hypothetical protein
TVAG_485570	-25.5	synaptotagmin, putative
TVAG_454160	-25.70	conserved hypothetical protein
TVAG_363990	-25.7	hypothetical protein
TVAG_331320	-25.8	Vesicle transport v-SNARE protein
TVAG_291060	-26.50	diaphanous
TVAG_032160	-32.2	hypothetical protein
TVAG_476350	-33.00	conserved hypothetical protein
TVAG_396070	-34.80	Charged multivesicular body protein
TVAG_459530	-39.80	vacuolar sorting protein SNF7
TVAG_345490	-39.8	M protein, serotype 24 precursor, putative
TVAG_470120	-45.10	protein tolA

TVAG_539120	-48.90	viral A-type inclusion protein
TVAG_222820	-50.70	Rho2
TVAG_366360	-52.4	Conserved hypothetical protein, QXW lectin repeat family
TVAG_539120	-52.4	hypothetical protein
TVAG_139450	-54.3	Involucrin, putative
TVAG_277610	-58.2	hypothetical protein
TVAG_535540	-63.7	hypothetical protein

4 CONCLUSÕES

- ✓ *T. vaginalis* possui estruturas semelhantes a amiloides em sua superfície celular, hidrogenossomos, complexo de Golgi, corpos multivesiculares e vesículas extracelulares
- ✓ As estruturas semelhantes a amiloides podem ter participação nos processos de (a) transformação ameboide; (b) formação de *clusters* celulares; e (c) interação parasito-levedura e parasito-hospedeiro.
- ✓ Estruturas primarias de proteínas envolvidas na patogenicidade de *T. vaginalis* e localizadas na superfície celular, hidrogenossomos ou vesículas extracelulares, tais como adesinas (AP65, AP53 e AP33) e TvTSPs, possuem um alto potencial amiloidogênico *in silico*.
- ✓ Os resíduos de aminoácidos de TvTSP8 previstos como altamente amiloidogênicos estão relacionados com o processo de formação de clusters em *T. vaginalis*

REFERÊNCIAS

- ADDA, C. G. et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is unstructured and forms amyloid-like fibrils. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 166, n. 2, p. 159-171, 2009.
- AFFONSO, A.L.; BENCHIMOL, M.; RIBEIRO, K.C.; LINS, U.; DE SOUZA, W. Further studies on the endocytic activity of *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, v.80, p. 403-413, 1994.
- AFFONSO, A.L.; DE ALMEIDA, J.C.; BENCHIMOL, M. Partial characterization of cytoplasmic compartments involved in the endocytic process of *Tritrichomonas foetus*. **European Journal of Cell Biology**, v. 72, p. 247-256, 1997.
- ALESSIO, C.; NYIRJESY, P. Management of Resistant Trichomoniasis. **Current infectious disease reports**, v. 21, n. 9, p. 31, 2019.
- ALTERI, C. J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 12, p. 5145-5150, 2007.
- ARDALAN, S.; LEE, B. C.; GARBER, G.E. *Trichomonas vaginalis*: the adhesins AP51 and AP65 bind heme and hemoglobin. **Experimental parasitology**, v. 121, n. 4, p. 300-306, 2009.
- BALBIRNIE, M.; GROTHE, R.; EISENBERG, D. S. An amyloid-forming peptide from the yeast prion Sup35 reveals a dehydrated β -sheet structure for amyloid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 5, p. 2375-2380, 2001.
- BARDAN, R.; DUMACHE, R.; DEMA, A.; CUMPANASA, A.; BUCURASA, V. The role of prostatic inflammation biomarkers in the diagnosis of prostate diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 47, p. 909-915, 2014.
- BARRATT, J. et al. Bulky trichomonad genomes: encoding a Swiss Army knife. **Trends in parasitology**, v. 32, n. 10, p. 783-797, 2016.
- BASTIDA-CORCUERA, F. D. et al. Antibodies to *Trichomonas vaginalis* surface glycolipid. **Sex Transm Infect**, v. 89, n. 6, p. 467-472, 2013.
- BENCHIMOL, M. New ultrastructural observations on the skeletal matrix of *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, v. 97, p. 408-416, 2005.
- BENCHIMOL, M. The hydrogenosome peripheral vesicle: similarities with the endoplasmic reticulum. **Tissue Cell**, v. 40, p. 61-74, 2008.
- BENCHIMOL, M. Trichomonads under microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v.10 p. 528-550, 2004.

BENCHIMOL, M.; BATISTA, C.; DE SOUZA, W. Fibronectin-and laminin-mediated endocytic activity in the parasitic protozoa *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **Journal of submicroscopic cytology and pathology**, v. 22, n. 1, p. 39-45, 1990.

BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. **The Journal of Protozoology**, v. 30, p. 422-425, 1983.

BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*: cytochemical visualization of the endoplasmic reticulum-Golgi complex and lipids. **Experimental Parasitology**, v. 59, p. 51-58, 1985.

BENCHIMOL, M.; DINIZ J.A.; RIBEIRO, K. The fine structure of the axostyle and its associations with organelles in Trichomonads. **Tissue Cell**, v. 2, p. 178-87, 2000.

BENCHIMOL, M.; ELIAS, C.A.; DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*: fine structure of freeze-fractured membranes. **The Journal of Protozoology**, v. 29, p. 348-353, 1982.

BENCHIMOL, M.; JOHNSON, P.J.; DE SOUZA, W. Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study. **Biology of the Cell**, v. 87, n. 3, p. 197-205, 1996.

BENCHIMOL, M.; PEREIRA-NEVES, A.; DE SOUZA, W. Pathogenesis of *Trichomonas vaginalis* in Humans. **Human Emerging and Re-emerging Infections: Viral and Parasitic Infections**, v. 1, p. 423-439, 2015.

BENCHIMOL, M.; RIBEIRO, K.C.; MARIANTE, R.M., ALDERETE, J.F. Structure and division of the Golgi complex in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **European Journal of cell biology**, v. 80, n. 9, p. 593-607, 2001.

BESINGI, R. N. et al. Functional amyloids in *Streptococcus mutans*, their use as targets of biofilm inhibition and initial characterization of SMU_63c. **Microbiology**, v. 163, n. 4, p. 488, 2017.

BHESANIA, A. H.; NARAYANKHEDKAR, A. Trichomoniasis—a review. **Int J Curr Microbiol Appl Sci**, v. 5, p. 731-741, 2016.

BISSIG, C.; ROCHIN, L.; VAN NIEL, G. PMEL amyloid fibril formation: the bright steps of pigmentation. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 9, p. 1438, 2016.

BOCHAROVA, O. V. et al. Annealing prion protein amyloid fibrils at high temperature results in extension of a proteinase K-resistant core. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 4, p. 2373-2379, 2006.

BOUCHEMAL, K.; BORIES, C.; LOISEAU, P. M. Strategies for Prevention and Treatment of *Trichomonas vaginalis* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 811-825, 2017.

BRASIL. Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005. Brasília. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, **Programa Nacional de DST e Aids**, p. 224, 2008.

BRUGEROLLE, G.; VISCOGLIOSI, E. Organization and composition of the striated roots supporting the Golgi apparatus, the so-called parabasal apparatus, in parabasalid flagellates. **Biology of the Cell**, v. 81, n. 3, p. 277-285, 1994.

BURKI, Fabien et al. The new tree of eukaryotes. **Trends in ecology & evolution**, 2019.

CALAMAI, M. et al. Nature and significance of the interactions between amyloid fibrils and biological polyelectrolytes. **Biochemistry**, v. 45, n. 42, p. 12806-12815, 2006.

CAO, Y.; MEZZENGA, R. Food protein amyloid fibrils: Origin, structure, formation, characterization, applications and health implications. **Advances in colloid and interface science**, 2019.

CÁRDENAS-GUERRA, R. E. et al. The iron-induced cysteine proteinase TvCP4 plays a key role in *Trichomonas vaginalis* haemolysis. **Microbes and infection**, v. 15, n. 13, p. 958-968, 2013.

CARLTON, J.M. et al. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. **Science**, v. 315, n. 5809, p. 207-212, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines: Trichomoniasis, 2015. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/tg2015/trichomoniasis.htm> >. Acesso em: 10 de outubro de 2019.

CHAN, C. X. J; LIPKE, P. N. Role of force-sensitive amyloid-like interactions in fungal catch bonding and biofilms. **Eukaryotic cell**, v. 13, n. 9, p. 1136-1142, 2014.

CHANNON, K.; MACPHEE, C. E. Possibilities for 'smart' materials exploiting the self-assembly of polypeptides into fibrils. **Soft Matter**, v. 4, n. 4, p. 647-652, 2008.

CHAPMAN, M. R. et al. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. **Science**, v. 295, n. 5556, p. 851-855, 2002.

CHEN, Y. et al. Amyloid-like staining property of RADA16-I nanofibers and its potential application in detecting and imaging the nanomaterial. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 2477, 2018.

CHERPES, T. L. et al. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. **Sexually transmitted diseases**, v. 33, n. 12, p. 747-752, 2006.

CHITI, F.; DOBSON, C. M. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 27-68, 2017.

CHUNG, M.C. et al. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.2, p. 155-180, 2005.

COCERES, V. M. et al. The C-terminal tail of tetraspanin proteins regulates their intracellular distribution in the parasite *Trichomonas vaginalis*. **Cellular microbiology**, v. 17, n. 8, p. 1217-1229, 2015.

CONCHILLO-SOLÉ, O. et al. AGGRESKAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. **BMC bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 65, 2007.

CREMADES, N.; DOBSON, C. M. The contribution of biophysical and structural studies of protein self-assembly to the design of therapeutic strategies for amyloid diseases. **Neurobiology of disease**, v. 109, p. 178-190, 2018.

CROW, E. T.; LI, L. Newly identified prions in budding yeast, and their possible functions. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2011. p. 452-459.

CUDMORE, S.L.; DELGATY, K.L.; HAYWARD-MCCLELLAND, S.F.; PETRIN, D.P.; GARBER, G.E. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 783-793, 2004.

DAS, S. et al. Amyloid fibrils: Versatile biomaterials for cell adhesion and tissue engineering applications. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 6, p. 1826-1839, 2018.

DE ANDRADE ROSA, I. et al. Cardiolipin in hydrogenosomes: evidence of symbiotic origin. **Eukaryotic Cell**, v. 5, p. 784-787, 2006.

DE FERRARI, G. V. et al. A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid β -peptide fibril formation. **Biochemistry**, v. 40, n. 35, p. 10447-10457, 2001.

DE MIGUEL, N. et al. Proteome analysis of the surface of *Trichomonas vaginalis* reveals novel proteins and strain-dependent differential expression. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, n. 7, p. 1554-1566, 2010.

DE MIGUEL, N.; Riestra, A.; JOHNSON, P.J. Reversible association of tetraspanin with *Trichomonas vaginalis* flagella upon adherence to host cells. **Cellular microbiology**, v. 14, n. 12, p. 1797-1807, 2012.

DIAS-LOPES, G. et al. In-Depth Quantitative Proteomic Analysis of Trophozoites and Pseudocysts of *Trichomonas vaginalis*, **Journal of Proteome Research**, v. 17, n. 11, p.3704-3718, 2018.

DONDERS, G. G.; DEPUYDT C. E.; BOGERS, J. P.; VEREECKEN A. J. Association of *Trichomonas vaginalis* and cytological abnormalities of the cervix in low risk women. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e86266, 2013.

DONNÉ, A. Animalcules observés dans lês matières purulentes et lê produit dès sécrétions des organes génitaux de l'homme et de la femme. **Académie des Scienses Paris**, v. 3, p. 385-386, 1836.

DUEHOLM, M. S. et al. Expression of Fap amyloids in *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, and *P. putida* results in aggregation and increased biofilm formation. **Microbiologyopen**, v. 2, n. 3, p. 365-382, 2013.

DUEHOLM, M. S. et al. Functional amyloid in *Pseudomonas*. **Molecular microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1009-1020, 2010.

DUNNE, L. R. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. **Cell Research**, v. 13, n.4, p.239-249, 2003.

EISENBERG, D. S.; SAWAYA, Michael R. Structural studies of amyloid proteins at the molecular level. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 69-95, 2017.

EMILY, M.; TALVAS, A.; DELAMARCHE, C. MetAmyl: a METa-predictor for AMYLoid proteins. **PloS one**, v. 8, n. 11, 2013.

ERSKINE, E.; MACPHEE, C. E.; STANLEY-WALL, N. R. Functional amyloid and other protein fibers in the biofilm matrix. **Journal of molecular biology**, v. 430, n. 20, p. 3642-3656, 2018.

FERNANDEZ-ESCAMILLA, A. M. et al. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1302-1306, 2004.

FICHOROVA, R. N. et al. The contribution of cervicovaginal infections to the immunomodulatory effects of hormonal contraception. **MBio**, v. 6, n. 5, p. e00221-15, 2015.

FIGUEROA-ÂNGULO, E.E. et al. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. **Microbes and infection**, v. 14, n. 15, p. 1411-1427, 2012.

FOWLER, D. M. et al. Functional amyloid formation within mammalian tissue. **PLoS Biol**, v. 4, n. 1, p. e6, 2005.

GARCIA, A.F.; ALDERETE, J.F. Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. **BMC microbiology**, v. 7, n. 1, p. 116, 2007.

GARCIA-SHERMAN, M.C. et al. Peptide detection of fungal functional amyloids in infected tissue. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e86067, 2014.

GAYDOS, C. A. et al. Clinical validation of a test for the diagnosis of vaginitis. **Obstetrics and gynecology**, v. 130, n. 1, p. 181, 2017.

GHOSH, A. P.; AYCOCK, C.; SCHWEBKE, J. R. In vitro study of the susceptibility of clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole and secnidazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 4, p. e02329-17, 2018.

GHOSH, D. et al. Complexation of amyloid fibrils with charged conjugated polymers. **Langmuir**, v. 30, n. 13, p. 3775-3786, 2014.

GHOSH, I. et al. Association between high risk human papillomavirus infection and co-infection with *Candida spp.* and *Trichomonas vaginalis* in women with cervical premalignant and malignant lesions. **Journal of Clinical Virology**, v. 87, p. 43-48, 2017.

GILCHRIST, K.B.; GARCIA, M.C.; SOBONYA, R.; LIPKE, P.N.; KLOTZ, S. A. New features of invasive candidiasis in humans: amyloid formation by fungi and deposition of serum amyloid P component by the host. **The Journal of infectious diseases**, v. 206, n. 9, p. 1473-1478, 2012.

GOTTLIEB S. L. et al. Incidence of herpes simplex virus type 2 infection in 5 sexually transmitted disease (STD) clinics and the effect of HIV/STD risk-reduction counseling. **The Journal of infectious diseases**, v. 190, n. 6, p. 1059-1067, 2004.

GREENWALD, J.; RIEK, R. On the possible amyloid origin of protein folds. **Journal of molecular biology**, v. 421, n. 4, p. 417-426, 2012.

GUERRERO-MUÑOZ, M. J.; GERSON, J.; CASTILLO-CARRANZA, D. L. Tau oligomers: The toxic player at synapses in Alzheimer's disease. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, p. 464, 2015.

GUYONNET, B.; EGGE, N.; CORNWALL, G. A. Functional amyloids in the mouse sperm acrosome. **Molecular and cellular biology**, v. 34, n. 14, p. 2624-2634, 2014.

HAMODRAKAS, S. J. Protein aggregation and amyloid fibril formation prediction software from primary sequence: towards controlling the formation of bacterial inclusion bodies. **The FEBS journal**, v. 278, n. 14, p. 2428-2435, 2011.

HEWETSON, A. et al. Functional amyloids in reproduction. **Biomolecules**, v. 7, n. 3, p. 46, 2017.

HIROTA-NAKAOKA, N. et al. Dissolution of β 2-microglobulin amyloid fibrils by dimethylsulfoxide. **Journal of biochemistry**, v. 134, n. 1, p. 159-164, 2003.

HIRT, R. P.; SHERRARD, J. *Trichomonas vaginalis* origins, molecular pathobiology and clinical considerations. **Current opinion in infectious diseases**, v. 28, n. 1, p. 72-79, 2015.

HIRT, R.P. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. **Sexually Transmitted Infections**, v. 89, n. 6, p. 439-443, 2013.

HOBBS, M. M.; SEÑA, A. C. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. **Sexually Transmitted Infections**, v. 89, n. 6, p. 434-438, 2013.

HONIGBERG, B.M.; BRUGEROLLE, G. Structure. In: Honigberg B.M. (Ed.), *Trichomonads parasitic in humans*, Springer-Verlag, New York, pp. 5-35, 1990.
HONIGBERG, B.M.; MATTERN, C.F.; DANIEL, W.A. Fine structure of the mastigont system in *Tritrichomonas foetus*. **The Journal of Protozoology**, v. 18, n. 2, p. 183-198, 1971.

HOWIE, A. J.; BREWER, D. B. Optical properties of amyloid stained by Congo red: history and mechanisms. **Micron**, v. 40, n. 3, p. 285-301, 2009.

HUANG, K.Y. et al. Comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Trichomonas vaginalis* following adherence to fibronectin. **Infection and immunity**, v. 80, n. 11, p. 3900-3911, 2012.

HUDSON, S. A. et al. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. **The FEBS journal**, v. 276, n. 20, p. 5960-5972, 2009.

IMAM, M. et al. *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 3 oligomerization, self-assembly, and heme complex formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 7, p. 3856-3868, 2014.

JACKSON, M. P.; HEWITT, E. W. Why are functional amyloids non-toxic in humans? **Biomolecules**, v. 7, n. 4, p. 71, 2017.

JACOB, R. S. et al. Amyloids Are Novel Cell-Adhesive Matrices. In: **Biochemical and Biophysical Roles of Cell Surface Molecules**. Springer, Singapore, p. 79-97, 2018.

JACOB, R. S.; ANOOP, A.; MAJI, S. K. Protein Nanofibrils as Storage Forms of Peptide Drugs and Hormones. In: **Biological and Bio-inspired Nanomaterials**. Springer, Singapore, p. 265-290, 2019.

JACOB, R.S.; GEORGE, E.; SINGH, P.K.; SALOT, S.; ANOOP, A.; et al. Cell adhesion on amyloid fibrils lacking integrin recognition motif. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 10, p. 5278-5298, 2016.

JAIN, N.; CHAPMAN, M. R. Bacterial functional amyloids: Order from disorder. **Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics**, v.1867, p.954-960, 2019.

KAYED, R. et al. Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. **Molecular neurodegeneration**, v. 2, n. 1, p. 18, 2007.

KIRKCALDY, Robert D. et al. *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD Surveillance Network, 2009–2010. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 6, p. 939, 2012.

KISSINGER, P. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 307, 2015.

KISSINGER, P.; ADAMSKI, A. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. **Sexually Transmitted Infections**, v. 89, n. 6, p. 426-433, 2013.

KUSDIAN, Gary et al. The actin-based machinery of *Trichomonas vaginalis* mediates flagellate-amoeboid transition and migration across host tissue. **Cellular microbiology**, v. 15, n. 10, p. 1707-1721, 2013.

KYLE, R. A. Amyloidosis: a convoluted story. **British journal of haematology**, v. 114, n. 3, p. 529-538, 2001.

LAMA, A. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 7, p. 2703-2711, 2009.

LEE, K.E. et al. Three-dimensional structure of the cytoskeleton in *Trichomonas vaginalis* revealed new features. **Journal of electron microscopy**, v. 58, n. 5, p. 305-313, 2009.

LEE, W. et al. Quantifying L-ascorbic acid-driven inhibitory effect on amyloid fibrillation. **Macromolecular Research**, v. 24, n. 10, p. 868-873, 2016.

LEITSCH, D. Recent advances in the *Trichomonas vaginalis* field. **F1000Research**, v. 5, 2016.

LEÔNCIO DE LIMA, M.C.; ALBUQUERQUE, T. V.; BARRETO NETO, A. C.; COVELLO REHN, V.N. Prevalência e fatores de risco independentes à tricomoníase em mulheres assistidas na atenção básica. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 26, n. 4, 2013.

LI, W.C. et al. *Pentatrichomonas hominis*: first isolation from the feces of a dog with diarrhea in China. **Parasitology research**, v. 113, n. 5, p. 1795-1801, 2014.

LI, Z. et al. Cryo-EM structures of the 80S ribosomes from human parasites *Trichomonas vaginalis* and *Toxoplasma gondii*. **Cell Research**, v. 27, n. 10, p. 1275-1288, 2017.

LINDMARK, D.G.; MÜLLER, M. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 22, p. 7724-7728, 1973.

LÖFMARK, S. et al. Metronidazole is Still the Drug of Choice for Treatment of Anaerobic Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n.1, p.16–23, 2010.

LU, C. et al. Interaction of merozoite surface protein 2 with lipid membranes. **FEBS letters**, v. 593, n. 3, p. 288-295, 2019.

LUSTIG, G.; RYAN, C.M.; SECOR, W.E.; JOHNSON, P.J. *Trichomonas vaginalis* contact-dependent cytolysis of epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 81, n. 5, p. 1411-1419, 2013.

MADDELEIN, M. L. et al. Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 11, p. 7402-7407, 2002.

MAJI, S. K. et al. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. **Science**, v. 325, n. 5938, p. 328-332, 2009.

MANN, K. M. et al. Analysis of the contribution of MTP and the predicted Flp pilus genes to *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. **Microbiology**, v. 162, n. 10, p. 1784, 2016.

MARTIN, C. H.; ROBERSON, M. Memoirs: Further Observations on the Caecal Parasites of Fowls, With some Reference to the Rectal Fauna of other Vertebrates. **Journal of Cell Science**, v. 2, n. 225, p. 53-81, 1911.

MELONI, D. et al. Molecular identification of *Pentatrichomonas hominis* in two patients with gastrointestinal symptoms. **Journal of clinical pathology**, v. 64, n. 10, p. 933-935, 2011.

MENEZES, C. B; FRASSON, A. P.; TASCA, T. “Trichomoniasis - are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide?” **Microbial cell**, vol. 3,9, p. 404-419, 2016.

MERCER, F.; JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis*: Pathogenesis, symbiont interactions, and host cell immune responses. **Trends in parasitology**, v. 34, n. 8, p. 683-693, 2018.

MEZA-CERVANTEZ, P. et al. Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. **Microbiology**, v. 157, n. 12, p. 3469-3482, 2011.

MIDDLEJ, V. et al. Zinc-clotrimazole complexes are effective against *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology**, v. 146, n. 9, p. 1206-1216, 2019.

MIELCZAREK, E.; BLASZKOWSKA, J. *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. **Infection**, v. 44, n. 4, p. 447-458, 2016.

- MIELCZAREK, E.; BLASZKOWSKA, J. *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. **Infection**, v. 44, n. 4, p. 447-458, 2016.
- MIRANDA-OZUNA, J. F.T et al. The glycolytic enzyme triosephosphate isomerase of *Trichomonas vaginalis* is a surface-associated protein induced by glucose that functions as a laminin-and fibronectin-binding protein. **Infection and immunity**, v. 84, n. 10, p. 2878-2894, 2016.
- MIRASOL-MELÉNDEZ, E. et al. Characterization of multiple enolase genes from *Trichomonas vaginalis*. Potential novel targets for drug and vaccine design. **Parasitology international**, v. 67, n. 4, p. 444-453, 2018.
- MOODLEY, P.; CONNOLLY, C.; STURM, A.W. Interrelationships among human immunodeficiency virus type I infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis, and the presence of yeasts. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 1, p. 69-73, 2002.
- MÜLLER, M. et al. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 76, n. 2, p. 444-495, 2012.
- MUNCH, J.; RÜCKER, E.; STÄNDKER, L.; ADERMANN, K.; GOFFINET, C.; et al. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1059-1071, 2007.
- NIEVAS, Y. R. et al. Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: characterization and their association with cell interaction. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 12, p. 2211-2226, 2018.
- NOËL, C. J. et al. *Trichomonas vaginalis* vast BspA-like gene family: evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 99, 2010.
- NYE, M. B.; SCHWEBKE, J. R.; BODY, B. A. Comparison of APTIMA *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 200, n. 2, p. 188. e1-188. e7, 2009.
- OLI, M. W. et al. Functional amyloid formation by *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 12, p. 2903, 2012.
- O'NUALLAIN, B.; WETZEL, R. Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1485-1490, 2002.
- OTZEN, D.; RIEK, R. Functional amyloids. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 12, p. a033860, 2019.
- PANDE, M.; SRIVASTAVA, R. Molecular and clinical insights into protein misfolding and associated amyloidosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 111753, 2019.

PASSOS, M.R.L. Tricomoníase: uma epidemia negligenciada. **Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis**, v. 18, n. 3, p. 159-160, 2006.

PEREIRA-NEVES, A.; BENCHIMOL, M. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. **Biology of the Cell**, v. 99, n. 2, p. 87-101, 2007.

PEREIRA-NEVES, A.; BENCHIMOL, M. *Trichomonas vaginalis*: in vitro survival in swimming pool water samples. **Experimental parasitology**, v. 118, n. 3, p. 438-441, 2008.

PHAM, C. L. L, et al. Functional amyloid: widespread in Nature, diverse in purpose. **Essays in biochemistry**, v. 56, p. 207-219, 2014.

QUAN, J. H. et al. *Trichomonas vaginalis* metalloproteinase induces mTOR cleavage of SiHa cells. **The Korean journal of parasitology**, v. 52, n. 6, p. 595, 2014.

QUEIROZ, R.C.; SANTOS, L.M.; BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. Cytochemical localization of enzyme markers in *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, v. 77, p. 561-566, 1991

RADA, P. et al. Investigation of the Secretory Pathway in *Trichomonas vaginalis* Argues against a Moonlighting Function of Hydrogenosomal Enzymes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 899-910, 2019.

RAI, A. K.; JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis* extracellular vesicles are internalized by host cells using proteoglycans and caveolin-dependent endocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 43, p. 21354-21360, 2019.

RAMSUGIT, S. et al. Pili contribute to biofilm formation in vitro in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 5, p. 725-735, 2013.

RIBEIRO, K.C.; BENCHIMOL, M.; FARINA, M. Contribution of cryofixation and freeze-substitution to analytical microscopy: a study of *Tritrichomonas foetus* hydrogenosomes. **Microscopy. Research and Technique**, v. 53, p. 87-92, 2001.

RIBEIRO, K.C.; MARIANTE, R.M.; COUTINHO, L.L.; BENCHIMOL, M. Nucleus behavior during the closed mitosis of *Tritrichomonas foetus*. **Biology of the Cell**, v. 94, n. 4-5, p. 289-301, 2002b.

RIBEIRO, K.C.; MONTEIRO-LEAL, L.H.; BENCHIMOL, M. Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 47, n. 5, p. 481-492, 2000.

RIBEIRO, K.C.; PEREIRA-NEVES, A.; BENCHIMOL, M. The mitotic spindle and associated membranes in the closed mitosis of trichomonads. **Biology of the Cell**, v. 94, n. 3, p. 157-172, 2002a.

RIBEIRO, L. C.; SANTOS, C.; BENCHIMOL, M. Is *Trichomonas tenax* a parasite or a commensal? **Protist**, v. 166, n. 2, p. 196-210, 2015.

RIESTRA, A. M. et al. A *Trichomonas vaginalis* rhomboid protease and its substrate modulate parasite attachment and cytolysis of host cells. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 12, 2015.

ROMERO, D.; KOLTER, R. Functional amyloids in bacteria. **International Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 65-73, 2014.

RYAN, C. M.; DE MIGUEL, N.; JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis*: current understanding of host–parasite interactions. **Essays in biochemistry**, v. 51, p. 161-175, 2011.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, D. B. et al. Characterization of a novel endogenous cysteine proteinase inhibitor, trichocystatin-3 (TC-3), localized on the surface of *Trichomonas vaginalis*. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 102, p. 87-100, 2018.

SCHWARTZ, K.; BOLES, B. R. Microbial amyloids—functions and interactions within the host. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 1, p. 93-99, 2013.

SCHWEBKE, J. R. et al. Molecular testing for *Trichomonas vaginalis* in women: results from a prospective US clinical trial. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4106-4111, 2011.

SCHWEBKE, J. R.; BARRIENTES, F. J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 12, p. 4209-4210, 2006.

SCHWEBKE, J.R., BURGESS, D. Trichomoniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 794-803, 2004.

SECOR, W. E. *Trichomonas vaginalis*: treatment questions and challenges. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 10, n. 2, p. 107-109, 2012.

SEÑA, A. C.; BACHMANN, L. H.; HOBBS, M. M. Persistent and recurrent *Trichomonas vaginalis* infections: epidemiology, treatment and management considerations. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 12, n. 6, p. 673-685, 2014.

SHERARD, J. et al. United Kingdom national guideline on the management of *Trichomonas vaginalis* 2014. **International journal of STD & AIDS**, v. 25, n. 8, p. 541-549, 2014.

SHEWMAKER, F.; MCGLINCHEY, R. P.; WICKNER, R. B. Structural insights into functional and pathological amyloid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 19, p. 16533-16540, 2011.

SILVER, B. J.; GUY R. J.; KALDOR J. M.; JAMIL M. S.; RUMBOLD A. R. *Trichomonas vaginalis* as a cause of perinatal morbidity: a systematic review and meta-analysis. **Sexually transmitted diseases**, v. 41, n. 6, p. 369-376, 2014.

SIPE, J. D. et al. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. **Amyloid**, v. 23, n. 4, p. 209-213, 2016.

SIPE, J. D.; COHEN, A. S. History of the amyloid fibril. **Journal of structural biology**, v. 130, n. 2-3, p. 88-98, 2000.

SOBEL, R.; SOBEL, J.D. Metronidazole for the treatment of vaginal infections. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 7, p. 1109-1115, 2015.

SOOD, S.; KAPIL, A. An update on *Trichomonas vaginalis*. **Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS**, v. 29, n. 1, p. 7-14, 2008.

STAIRS, C. W.; LEGER, M. M.; ROGER, A. J. Diversity and origins of anaerobic metabolism in mitochondria and related organelles. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1678, p. 20140326, 2015.

SUGIMOTO, Y. et al. Aggregates with lysozyme and ovalbumin show features of amyloid-like fibrils. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 89, n. 6, p. 533-544, 2011.

SUTCLIFFE, S.; GIOVANNUCCI, E.; ALDERETE J. F.; CHANG T. H.; GAYDOS C. A.; ZENILMAN J. M.; et al. Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 15, n. 5, p. 939-945, 2006.

TOLBERT, M. K. et al. Species identification of trichomonads and associated coinfections in dogs with diarrhea and suspected trichomonosis. **Veterinary parasitology**, v. 187, n. 1-2, p. 319-322, 2012.

TOYAMA, B. H.; WEISSMAN, J. S. Amyloid structure: conformational diversity and consequences. **Annual review of biochemistry**, v. 80, p. 557-585, 2011.

TSOLIS, A. C. et al. A consensus method for the prediction of 'aggregation-prone' peptides in globular proteins. **PloS one**, v. 8, n. 1, 2013.

TWU, O. et al. *Trichomonas vaginalis* homolog of macrophage migration inhibitory factor induces prostate cell growth, invasiveness, and inflammatory responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 22, p. 8179-8184, 2014.

VAN DER POL, B. Clinical and laboratory testing for *Trichomonas vaginalis* infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 1, p. 7-12, 2016.

VASSAR, P. S.; CULLING, C. F. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. **Archives of pathology**, v. 68, p. 487-498, 1959.

VIIKKI, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. **Acta Oncologica**, v. 39, n. 1, p. 71-75, 2000.

WANG, L. et al. Antimicrobial activity and molecular mechanism of the CRES protein. **PLoS One**, v. 7, n. 11, 2012.

WASMER, C. et al. Amyloid fibrils of the HET-s (218–289) prion form a β solenoid with a triangular hydrophobic core. **Science**, v. 319, n. 5869, p. 1523-1526, 2008.

WATT, B.; NIEL, G.; RAPOSO, G.; MARKS, M.S. PMEL: a pigment cell-specific model for functional amyloid formation. **Pigment cell & melanoma research**, v. 26, n. 3, p. 300-315, 2013.

WENRICH, D. H. et al. Morphology of the Intestinal Trichomonad Flagellates in Man and of Similar Forms in Monkeys, Cats, Dogs and Rats. **Journal of morphology**, v. 74, n. 1, p. 189-211, 1944.

WHELLY, S. et al. Cystatin-related epididymal spermatogenic subgroup members are part of an amyloid matrix and associated with extracellular vesicles in the mouse epididymal lumen. **Mhr: Basic science of reproductive medicine**, v. 22, n. 11, p. 729-744, 2016.

WHELLY, S. et al. Nonpathological extracellular amyloid is present during normal epididymal sperm maturation. **PloS one**, v. 7, n. 5, 2012.

WICKNER, R. B. et al. Prions of fungi: inherited structures and biological roles. **Nature reviews microbiology**, v. 5, n. 8, p. 611-618, 2007.

WICKNER, R. B. et al. Prions: proteins as genes and infectious entities. **Genes & development**, v. 18, n. 5, p. 470-485, 2004.

WØLNER-HANSEN, P. et al. Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. **Jama**, v. 261, n. 4, p. 571-576, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on global sexually transmitted infections surveillance. **Geneva: WHO**, 2018.

YAMAMOTO, S. et al. Inflammation-induced endothelial cell-derived extracellular vesicles modulate the cellular status of pericytes. **Scientific reports**, v. 5, p. 8505, 2015.

YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of extracellular vesicles**, v. 4, n. 1, p. 27066, 2015.

YANG, W. et al. The propensity of the bacterial rodlin protein RdlB to form amyloid fibrils determines its function in *Streptomyces coelicolor*. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.