

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**FORMAÇÃO DE PSEUDOCISTOS EM *TRICHOMONAS VAGINALIS*: UMA  
ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL, ESTRUTURAL E PROTEÔMICA**

**GEOVANE DIAS LOPES**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Genética e Bioquímica. A tese foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

**Orientador: Prof. Dr. José Batista de Jesus**

**RIO DE JANEIRO**

2018

Dias Lopes, Geovane.

Formação de pseudocistos em *Trichomonas vaginalis*: uma análise ultraestrutural, estrutural e proteômica / Geovane Dias Lopes. - Rio de Janeiro, 2018.

xiii, 107 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientador: José Batista de Jesus.

Bibliografia: f. 92-107

1. *Trichomonas vaginalis*. 2. Pseudocisto. 3. Ferro. 4. Ultraestrutura. 5. Espectrometria de massas. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR:** GEOVANE DIAS LOPES

**FORMAÇÃO DE PSEUDOCISTOS EM *TRICHOMONAS VAGINALIS*: UMA  
ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL, ESTRUTURAL E PROTEÔMICA**

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. José Batista de Jesus

**Aprovada em:** 28/05/2018

**EXAMINADORES:**

Dra. Mariana Caldas Waghbi - Presidente

Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva

Dr. Richard Hemmi Valente

Dr. Antônio Pereira Neves

Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto

Rio de Janeiro, maio de 2018

**They are in you and in me; they created us, body and mind; and their preservation is the ultimate rationale for our existence. They have come a long way, those replicators. Now they go by the name of genes, and we are their survival machines.”**

Richard Dawkins, *The Selfish Gene*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Dr. José Batista pela minha iniciação na carreira científica e por todo ensinamento durante nove anos de convivência;

A minha orientadora Dra. Patrícia Cuervo pela ajuda em todas etapas da minha tese, além das críticas e sugestões que contribuem para minha formação científica e pessoal;

A Dra. Constança Britto por me acolher em seu laboratório e poder contar com sua ajuda sempre que precisei;

A Juliana Peixoto pela ajuda em diversas etapas do trabalho;

A Dra. Nathalia Pinho pela ajuda nos inúmeros experimentos proteômicos e correção das figuras infinitas vezes;

Ao Dr. Gabriel Padron que mudou meu jeito de estudar as proteínas e fazer ciência;

Ao Dr. Jacek Wisniewski pelo auxílio na parte experimental e ensinamentos na parte de análise de dados proteômicos;

A Dra. Cássia Castro que me ajudou desde o início do doutorado, em muitos experimentos e discussões de artigos;

Ao Dr. Vítor Vidal pela paciência e ajuda nos experimentos que nunca davam certo;

Ao Dr. Francisco Odêncio por todo ensinamento na parte de microscopia;

A Dra. Mirian Claudia de Souza Pereira pela colaboração e discussão na parte de microscopia;

A Dra. Elisa Cupolillo pelos ensinamentos sobre ciência, pós-graduação, Instituição, e a oportunidade de entender melhor o nosso processo de formação acadêmico;

A Dra. Mariana Caldas Waghbi pela revisão da tese com contribuições fundamentais para aprimorá-la;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas pela colaboração no desenvolvimento da tese e por todos os momentos de descontração;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

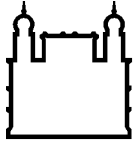
A Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela premiação com a Bolsa Nota 10;

As plataformas tecnológicas de Microscopia Eletrônica e de Citometria de Fluxo do IOC;

A Maria Fantinatti por tudo;

Aos meus pais, Gislene e Marco Aurélio, e meus irmãos, Marcus e Alexandre, a base da minha vida;

A todos da minha família pelo apoio incondicional.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

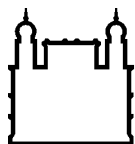
### FORMAÇÃO DE PSEUDOCISTOS EM *TRICHOMONAS VAGINALIS*: UMA ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL, ESTRUTURAL E PROTEÔMICA

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Geovane Dias Lopes

*Trichomonas vaginalis* é o agente etiológico da tricomoníase em humanos, uma infecção sexualmente transmissível comum e global. O ciclo de vida deste parasito apresenta a forma de trofozoíto sem um estágio cístico. Entretanto, a presença de formas esféricas com flagelos internalizados e viáveis, denominadas pseudocistos, tem sido comumente observada neste parasito. Como estão em baixa proporção em cultivo axênico, a padronização de métodos de indução é fundamental para se estudar esta forma. Além disso, existem poucos estudos moleculares para compreender a formação de pseudocistos. Neste trabalho, investigamos o efeito do ferro na dinâmica da formação de pseudocistos caracterizando a mudança morfológica destes pseudocistos induzidos pela depleção de ferro por microscopia ótica e eletrônica, bem como os mecanismos moleculares envolvidos nesta transformação através de um estudo proteômico quantitativo baseado em espectrometria de massas. Foi observado que a depleção de ferro induz uma mudança morfológica dos trofozoítos replicativos em pseudocistos, formas arredondadas, não multiplicativas e sem motilidade. Esta transformação morfológica está relacionada a (i) uma mudança metabólica em direção a um fenótipo menos glicolítico, (ii) alterações na abundância de maquinário de montagem hidrogenossômica ferro-enxofre (ISC); (iii) aumento da abundância de partículas reguladoras do sistema ubiquitina-proteassoma; (iv) alterações significativas nas proteínas envolvidas na adesão e reorganização do citoesqueleto; (v) parada na fase G2/M associada a alterações na abundância de proteínas reguladoras do ciclo celular. Tais dados confirmam que os pseudocistos sofrem importantes alterações fisiológicas e estruturais para sobreviver sob condições ambientais desfavoráveis.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### PSEUDOCYST FORMATION: AN ULTRASTRUCTURAL, STRUCTURAL AND PROTEOME ANALYSIS

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Geovane Dias Lopes**

*Trichomonas vaginalis* is a sexually transmitted anaerobic parasite that infects humans causing trichomoniasis, a very common sexually transmitted disease. The life cycle of this parasite possesses a trophozoite form without a cystic stage. However, the presence of viable and spherical forms with internalized flagella, denominated pseudocysts, has been commonly observed for this parasite. Pseudocysts are in low proportion in axenic culture; therefore, the standardization of induction methods is fundamental to study this form. In addition, the molecular mechanisms regulating the dynamics of trophozoite transformation into a pseudocyst are unknown. We investigated the effects of iron on the dynamics of pseudocyst formation and the morphological characterization of these iron-depletion induced pseudocysts by optical and electron microscopy, as well as the molecular mechanisms involved in the formation through a deep quantitative proteomic study based on mass spectrometry using a label-free approach. It was observed that iron depletion induces a morphological change of replicative trophozoites in pseudocysts, rounded, non-multiplicative and non-motile forms. This morphological transformation of trophozoite to pseudocysts is coupled to (i) a metabolic shift towards a less glycolytic phenotype, (ii) alterations in the abundance of hydrogenosomal iron-sulfur cluster (ISC) assembly machinery; (iii) increased abundance of regulatory particles of the ubiquitin–proteasome system; (iv) significant alterations in proteins involved in adhesion and cytoskeleton reorganization; (v) arrest in G2/M phase associated to alterations in the abundance of regulatory proteins of the cell cycle. Such data supports that pseudocysts suffer important physiological and structural alterations for survive under unfavorable environmental conditions.



## ÍNDICE GERAL

	Agradecimentos.....	v
	Índice geral.....	ix
	Índice de figuras .....	xi
	Lista de siglas e abreviaturas .....	xii
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
	<b>1.1 <i>Trichomonas vaginalis</i></b> .....	<b>1</b>
	1.1.1 Taxonomia.....	1
	1.1.2 Morfologia.....	2
	1.1.3 Ultraestrutura celular.....	4
	1.1.4 Metabolismo energético.....	6
	1.1.5 Mecanismos de patogenicidade .....	9
	1.1.6 Tricomoníase .....	12
	<b>1.2 Genoma</b> .....	<b>13</b>
	<b>1.3 Proteômica</b> .....	<b>15</b>
	1.3.1 Proteoma.....	15
	1.3.2 Abordagens proteômicas.....	17
	1.3.3 Proteômica quantitativa .....	19
	1.3.4 Estudos proteômicos de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	22
	<b>1.4 Justificativa</b> .....	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
	<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>25</b>
	<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO 1</b>	<b>26</b>
	<b>3.1 Estado da arte</b> .....	<b>26</b>
	<b>3.2 Questões propostas no trabalho</b> .....	<b>26</b>
	<b>3.3 Resultados e contribuições para a área de estudo</b> .....	<b>26</b>
	<b>3.4 Morphologic study of the effect of iron on pseudocyst formation in <i>Trichomonas vaginalis</i> and its interaction with human epithelial cells</b> .....	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO 2</b>	<b>38</b>

4.1	Estado da arte.....	38
4.2	Questões propostas no trabalho .....	38
4.3	Resultados e contribuições para a área de estudo .....	39
4.4	In-depth quantitative proteomic analysis of trophozoites and pseudocysts of <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	39
5	DISCUSSÃO	79
6	PERSPECTIVAS	90
7	CONCLUSÕES	91
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	3
Figura 2. Esquema das estruturas celulares e as principais organelas de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	4
Figura 3. Via metabólica de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	7

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- BVEC – “bovine vaginal epithelial cells” células do epitélio vaginal de bovinos
- CDF - “cell-detaching factor” fator de descamação celular
- CoA - coenzima A
- CP- cisteína protease
- DIP - 2,2-dipiridil
- DNA - “deoxyribonucleic acid” ácido desoxirribonucleico
- DTT - ditioneitol
- ESI - “electrospray ionization” ionização por eletrospray
- FDR - “false Discovery Rate” taxa de identificações falsas
- Fdx - ferredoxina
- Fe - ferro
- FeS - ferro-enxofre
- GO - “gene ontology” ontologia gênica
- HeLa - linhagem celular de carcinoma uterino humano
- IAA - iodoacetamida
- IST - infecção sexualmente transmissível
- iTRAQ - “isobaric tag for relative and absolute quantitation” marcação isobárica para quantificação relativa e absoluta
- LEP - lisil-endopeptidase
- MALDI - “matrix-assisted laser desorption/ionization” ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz
- MED - “multi-enzyme digestion” digestão com múltiplas enzimas
- MET - microscopia eletrônica de transmissão
- MEV - microscopia eletrônica de varredura
- MO - membrana ondulante
- MS - “mass spectrometry” espectrometria de massas
- NAD- “nicotinamide adenine dinucleotide” nicotinamida adenina dinucleotídeo
- PBS - “phosphate-buffered saline” tampão fosfato salino
- PFO - piruvato ferredoxina:oxidoreductase
- PSM - “peptide spectrum match” correspondência espectro-peptídeo
- RNA - “ribonucleic acid” ácido ribonucleico
- SDS-PAGE - “sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis” eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

SILAC - “stable isotope labeling by amino acids in cell culture”  
marcação isotópica estável por aminoácidos em culturas de células

SNARE - “soluble N-ethylmaleimide sensitive factor-attachment protein  
receptor” proteínas solúveis que se ligam à NSF

TPA - “total protein analysis” análise de proteína total

VEC - “vaginal epithelial cell” célula epitelial vaginal

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Trichomonas vaginalis*

### 1.1.1 Taxonomia

*Trichomonas vaginalis* (Donné, 1836) é um eucarioto unicelular que se reproduz por divisão binária. Este protozoário é designado como um eucarioto primitivo por alguns autores, porém o aumento de dados moleculares e aplicação de novos métodos filogenéticos sugerem que são organismos altamente evoluídos e especializados para seus ambientes específicos (Dacks et al. 2008). As diversas classificações dos protozoários eucariotos refletem as divergências dos critérios utilizados. Uma das propostas é a utilização de supergrupos, o que contribui para a atualização da classificação, evitando o reconhecimento de grupamentos duvidosos que necessitem de uma investigação mais aprofundada. Nesta classificação, *T. vaginalis* pertence ao supergrupo Excavata cuja característica principal é uma depressão ou irregularidade ventral devido à presença de uma estrutura destinada à captura e ingestão de alimento em suspensão (Adl et al. 2012). Em outra classificação, este protozoário pertence ao filo Parabasalia e família Trichomonadidea. Este filo agrupa organismos que apresentam características metabólicas e de citoesqueleto típicas: presença de hidrogenossomos; pelo menos um aparato basal, formado pelo complexo de Golgi associado aos filamentos parabasais; complexo pelta-axóstilo, formado por um sistema de microtúbulos. Parabasalia engloba espécies de comensais de vertebrados e invertebrados, endossimbiontes de invertebrados, algumas espécies de vida livre, além de parasitos de importância médica e veterinária (Noda et al. 2012). Outra proposta de classificação é fundamentada por Cavalier-Smith (2013) segundo o qual o gênero *Trichomonas* pertence ao filo Louksozoa, ao subfilo Metamonada, à superclasse Parabasalia, à classe Trichomonadea, à ordem Trichomonadida e à família Trichomonadidae. Esta proposta de classificação defende o fato de que os organismos do grupo Metamonada são anaeróbicos que evoluíram de um ancestral aeróbico. Os hidrogenossomos seriam mitocôndrias que perderam DNA e citocromos (Cavalier-Smith 2013).

Os tricomonádídeos são agentes etiológicos de doenças com um alto impacto social e econômico. *Tritrichomonas foetus* é responsável pela tricomoníase bovina, responsável pela infertilidade e abortos, o que acarreta prejuízos financeiros. Além disso, este protozoário é capaz de infectar o intestino grosso de gatos provocando diarreia (Šlapeta et al. 2010). *Trichomonas gallinae* infecta o trato digestivo superior de aves, causando a tricomoníase aviária. Esta infecção foi relatada em aves de vários continentes, especialmente em columbiformes (Amin et al. 2014). Finalmente, *Trichomonas vaginalis* é agente etiológico da tricomoníase urogenital humana (TUH).

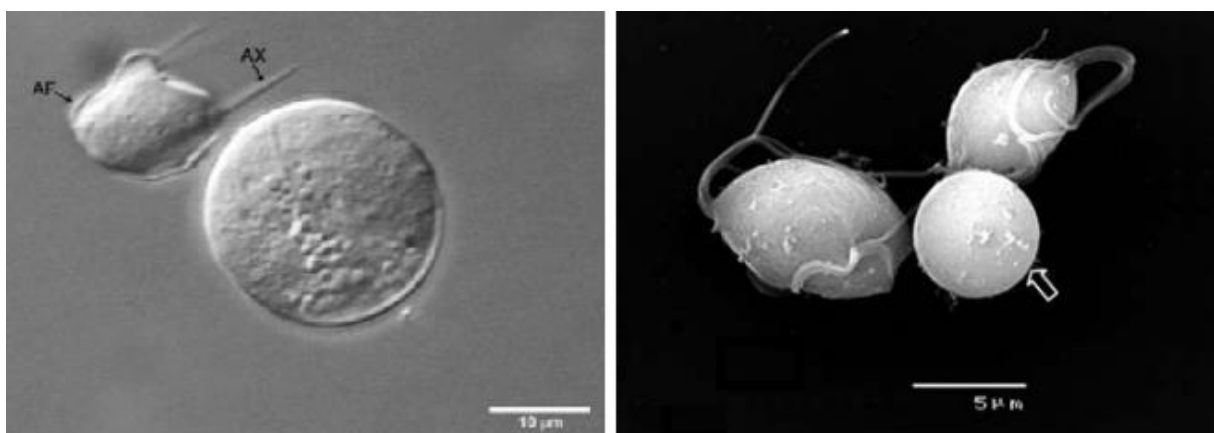
### 1.1.2 Morfologia

Os trofozoítos de *T. vaginalis* apresentam formato elipsoide quando cultivados em meio axênico, possuindo aproximadamente 10 e 7 µm de comprimento e largura respectivamente quando corados (Petrin et al. 1998). Em amostras a fresco, observa-se que o tamanho das células pode ser até duas vezes maior. Este protozoário possui quatro flagelos anteriores e um flagelo recorrente associado à uma especialização da membrana celular formando a membrana ondulante (Petrin et al. 1998). Quando cultivados por longos períodos *in vitro*, diversas características dos parasitos provenientes de isolados clínicos frescos são reduzidas, tais como adesão às células epiteliais, transformação morfológica, citotoxicidade e fagocitose (Cuervo et al. 2008).

O ciclo de vida dos tricomonádídeos apresenta apenas a forma de trofozoíto sem um verdadeiro estágio cístico. Dentre as exceções estão algumas espécies de tricomonádídeos (*Trichomitus batrachorum*, *Trichomitus sanguisuga* e *Ditrichomonas honigbergii*) que possuem cistos verdadeiros (Mattern et al. 1973, Brugerolle 1975, Farmer 1993). Além disso, a presença de formas esféricas com flagelos internalizados, denominados pseudocistos ou formas endoflagelares, tem sido comumente reportada nesses parasitos (Lipman et al. 1999, Granger et al. 2000, Pereira-Neves et al. 2003, Madeiro da Costa e Benchimol 2004, Pereira-Neves et al. 2011, Pereira-Neves et al. 2012, Ribeiro et al. 2015, Castro et al. 2016). O termo pseudocisto refere-se à forma arredondada, sem motilidade e que apresenta todos os flagelos internalizados. No início do século XX, a designação destas formas “aflageladas” era controversa. Alguns autores as consideravam artefatos, outros não as reconheciam como forma dos tricomonádídeos, e outros ainda as descreviam como espécimes em degeneração (Pereira e Almeida 1940; Pereira-Neves et al.

2012). Wenrich (1939) designou esta forma "aflagelada" como pseudocisto uma vez que apresentava características semelhantes às de cistos de outros protozoários, porém não apresentava a parede cística. Ele acreditava que se tratava de uma forma irreversível e degenerativa. O termo passou a ser aceito na literatura, mas o conceito de pseudocisto como forma degenerativa foi alterado à medida que estudos mostraram seu papel na infecção. Recentemente, Pereira-Neves e colaboradores sugeriram a utilização do termo "formas endoflagelares", uma vez que os flagelos continuam presentes dentro da célula, e esta forma é ativa e pode desempenhar um papel fundamental no ciclo de vida do protozoário (Pereira-Neves et al. 2012). Vale ressaltar que, embora os flagelos encontrem-se internalizados nos pseudocistos, é possível observar seus batimentos (Granger et al. 2000, Pereira-Neves et al. 2011, Castro et al. 2016).

Em cultivo axênico, é possível observar tanto trofozoítos quanto estas formas endoflagelares, porém em baixa proporção (Figura 1). Os pseudocistos são observados principalmente sob condições desfavoráveis de crescimento (depleção de nutrientes, choque térmico e tratamento com drogas) (Lipman et al. 1999, Granger et al. 2000, Pereira-Neves et al. 2003, Madeiro da Costa e Benchimol 2004, Pereira-Neves et al. 2011, Pereira-Neves et al. 2012, Ribeiro et al. 2015, Castro et al. 2016). Especificamente em *T. vaginalis*, pseudocistos foram observados naturalmente em pacientes com neoplasia cervical (Afzan e Suresh 2012) ou *in vitro* induzidos por depleção de ferro (De Jesus et al. 2007a; Dias-Lopes et al. 2017). Atualmente, diferentes métodos de indução de formação de pseudocisto *in vitro* foram estabelecidos, viabilizando a expansão de estudos sobre esta forma evolutiva.

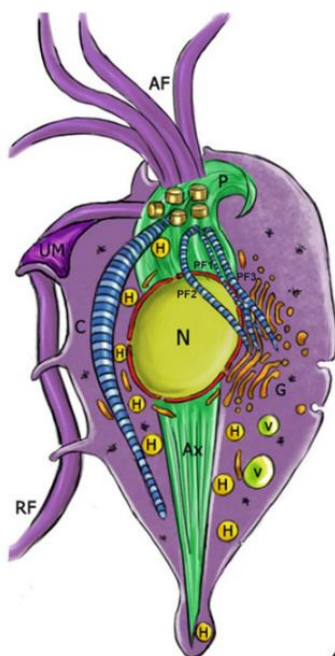


**Figura 1. Morfologia de *Trichomonas vaginalis*.** (A) Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC); (B) Microscopia eletrônica de varredura. Parasitos elipsoides com flagelos e axóstilo evidente e formas esféricas com todos os flagelos internalizados. AX: axóstilo; AF: flagelos anteriores. Seta indica a internalização dos flagelos. Retirado de De Jesus e colaboradores 2004; 2007.



### 1.1.3 Ultraestrutura celular

*Trichomonas vaginalis* é um parabasalídeo que apresenta estruturas de citoesqueleto como os flagelos, costa, aparelho parabasal e complexo pelta-axóstilo (Figura 2). A tubulina é o componente principal de estruturas como axóstilo e pelta, formado por microtúbulos estáveis (Benchimol 2005; Ribeiro et al. 2000; 2002). O axóstilo, que se projeta até a extremidade posterior, estaria relacionado com a função de suporte, enquanto a pelta é responsável pela sustentação da parede do canal periflagelar (Honigberg e Brugerolle 1990; Benchimol 2005). O axóstilo participa no processo de divisão celular proporcionando constrição do núcleo durante a cariocinese (Ribeiro et al. 2000).



**Figura 2. Esquema das estruturas celulares e as principais organelas de *Trichomonas vaginalis*.** Ax: axóstilo; AF: flagelos anteriores; RF: flagelo recorrente; UM: membrana ondulante; H: hidrogenossomo; N: núcleo; P: pelta; PF: filamento parabasal; C: costa; G: complexo de Golgi. Retirado de Benchimol, 2010.

O parasito também apresenta corpúsculos basais e seus filamentos associados, de onde emergem os flagelos e as demais estruturas relacionadas ao movimento (Honigberg et al. 1971; Ribeiro et al. 2000). Estudos demonstraram que em pseudocistos de *T. foetus* induzidos por baixa temperatura, o axóstilo apresenta uma forma curva (Mariante et al. 2004; Pereira-Neves et al. 2003; 2011; Pereira-Neves e Benchimol 2009). Em um trabalho mais recente, utilizando microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução, foi observado que nestes pseudocistos o núcleo está posicionado no centro do axóstilo e a pelta envolvendo o canal

periflagelar. Neste caso, o axóstilo é bem menor e apresenta uma borda irregular, o que sugere uma fragmentação desta estrutura (Andrade Rosa et al. 2015).

A costa é uma estrutura complexa e organizada, composta predominantemente por proteínas organizadas em estruturas filamentosas. Esta estrutura começa na região anterior entre o corpo basal do flagelo recorrente e os corpos basais do flagelo anterior, estendendo-se para a região posterior da célula (Honigberg et al. 1971; Benchimol 2004; 2010). É uma estrutura estável que durante a formação do pseudocisto, torna-se curvada (Pereira-Neves et al. 2003; Andrade Rosa et al. 2015). Além disso, durante o processo de transformação em pseudocisto, a rede de filamentos que conecta a costa no flagelo recorrente é perdida, provavelmente devido à internalização dos flagelos (Andrade Rosa et al. 2015). Em um estudo recente, 54 proteínas que compõem a costa foram identificadas, a maioria com domínios não caracterizados e nenhuma função relacionada de acordo com a ontologia gênica. Destas proteínas, sete com regiões ricas em domínios estruturais “coiled-coil”. Este domínio está presente em fibras estriadas de outros protozoários bem como em filamentos intermediários (Andrade Rosa et al. 2017).

*Trichomonas vaginalis* possui apenas um complexo de Golgi bem desenvolvido com 8 a 12 cisternas (Benchimol et al. 2001). Esta organela não se fragmenta durante o ciclo celular de *T. vaginalis*, mas divide-se por golgicinese na parte final da mitose (Benchimol et al. 2001). O complexo de Golgi está ligado, por finas pontes filamentosas, aos filamentos parabasais que são estruturas cilíndricas e periódicas com estriação transversal. O aparato parabasal é formado pelo complexo de Golgi e os filamentos parabasais (Honigberg e Brugerolle 1990; Benchimol et al. 2001). É importante destacar ainda que está associado com a produção de adesinas, visto que é intensamente marcado com anticorpos para AP65 e AP51 (Benchimol et al. 2001).

Em tricomonadídeos, a divisão celular é classificada como mitose fechada com fuso extranuclear, em que o envelope nuclear permanece e por isso, não há contato entre os cromossomos e os microtúbulos (Ribeiro et al. 2002). As estruturas do citoesqueleto como o sistema pelta-axóstilo, corpos basais, costa e flagelos são duplicados em uma fase pré-mitótica. Estas estruturas apresentam papéis fundamentais. Como dito anteriormente, o axóstilo está envolvido na cariocinese e os flagelos são importantes na citocinese (Ribeiro et al. 2000). Pseudocistos de *T. foetus* induzidos por baixa temperatura são células multinucleadas e polimastigontes

que apresentam um processo de mitose distinto dos trofozoítos. Neles, não ocorre participação do axóstilo na cariocinese; esta função é desempenhada pelo fuso pólo-núcleo. Assim, a divisão nuclear ocorre sem a correspondente divisão citoplasmática (Pereira-Neves e Benchimol 2009).

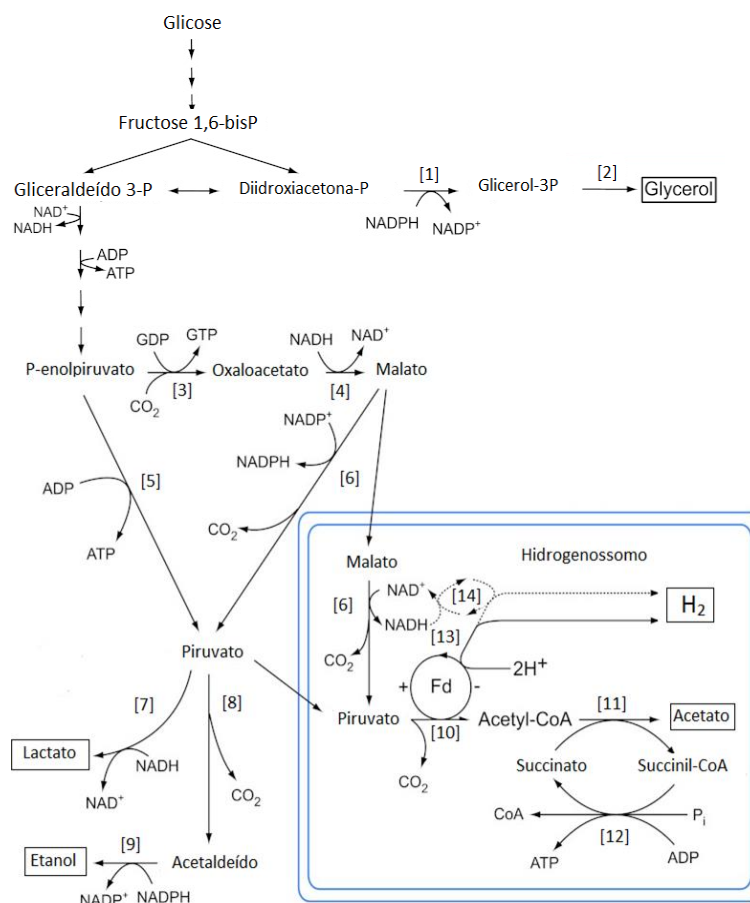
Os hidrogenossomos são organelas com dupla membrana e um diâmetro de 0,3 a 0,6  $\mu\text{m}$ . Estão distribuídos principalmente na região perinuclear e próximos ao axóstilo e costa, apresentam uma ou mais vesículas periféricas ricas em  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e P, e por isso, poderiam estar relacionados à regulação do cálcio intracelular (Chapman et al. 1985, Ribeiro et al. 2001). Estas organelas compartilham uma origem evolutiva com as mitocôndrias (Benchimol 2008; 2009). As principais características que definem os 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 (Muller et al. 2012). É importante destacar que existem mitocôndrias produtoras de hidrogênio, no caso, ciliado anaeróbico *Nyctotherus ovalis*, que vive no intestino de baratas, apresentam um genoma rudimentar que codifica componentes de uma cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, além da hidrogenase, provavelmente adquirida por um evento de transferência lateral (Boxma et al. 2007).

Os hidrogenossomos participam do metabolismo energético de *T. vaginalis*, sendo essenciais para a obtenção de energia para a célula. Como apresentam uma via metabólica distinta das mitocôndrias, estas organelas são alvos dos fármacos utilizados atualmente para o tratamento da tricomoníase (Benchimol 2008; 2009). Neste contexto, a compreensão das características bioquímicas desta organela é fundamental para auxiliar o estudo de novos alvos terapêuticos.

#### **1.1.4 Metabolismo energético**

*Trichomonas vaginalis* é um organismo anaeróbico. Também pode ser considerado um organismo microaerófilo, uma vez que possui meios bioquímicos para tolerar baixas quantidades de  $\text{O}_2$  (Müller et al. 2012). O metabolismo dos carboidratos apresenta uma etapa no citoplasma e outra no hidrogenossomo (Figura 3).

No citoplasma, ocorre a via clássica de Embden-Meyerhoff-Parnas, em que após diversas etapas de reações enzimáticas, a glicose é convertida em piruvato.



**Figura 3. Via metabólica de *Trichomonas vaginalis*.** Principais etapas da glicólise no citosol com a formação de glicerol, lactato e etanol. Piruvato e malato entram no hidrogenossomo e seu processamento leva à formação de hidrogênio molecular, acetato e CO<sub>2</sub>. Adaptado de Müller e colaboradores 2012.

1, glicerol-3-fosfato desidrogenase; 2, glicerol-3-fosfatase; 3, fosfoenolpiruvato carboxiquinase; 4, malato desidrogenase; 5, piruvato quinase; 6, enzima málica; 7, lactato desidrogenase; 8, piruvato descarboxilase; 9, álcool desidrogenase (NADPH dependente); 10, piruvato-ferrodoxina oxidoreductase; 11, acetato:succinato CoA-transferase; 12, succinil-CoA sintetase; 13, hidrogenase; 14, ferredoxina.

No hidrogenossomo, o malato é convertido em piruvato e CO<sub>2</sub> pela enzima málica. O piruvato é processado através de reações catalisadas por duas proteínas [FeS]: [4Fe–4S] piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFO), [4Fe–4S] hidrogenase. A PFO é responsável pela conversão do piruvato em acetil-coenzima A (acetil-CoA) e CO<sub>2</sub>. A molécula de acetil-CoA gerada é utilizada para a produção de ATP. Os elétrons liberados pela PFO são transferidos pela ferredoxina para a hidrogenase para produção de hidrogênio molecular (H<sub>2</sub>). Os elétrons liberados pelo malato reduzem NAD<sup>+</sup>, e são transferidos para a ferredoxina pela atividade da PFO (Müller et al. 2012).

Como dito anteriormente, a via metabólica do hidrogenossomo é alvo da classe de medicamentos aprovados e comprovadamente eficazes no tratamento da TUH. O metronidazol e outros derivados 5-nitroimidazólicos penetram por difusão passiva na célula e dentro nos hidrogenossomos tornam-se o acceptor preferencial dos elétrons gerados pela PFO (Kulda 1999). Assim, estes pró-fármacos são

ativados ao sofrerem uma reação de redução e tornam-se tóxicos (Petrin *et al.* 1998). Diferentes cepas de *T. vaginalis* e *T. foetus* cultivadas *in vitro* com a droga por um tempo prologando, diminuem o metabolismo hidrogenossomal. Ocorre uma diminuição e perda da atividade da PFO, da ferroxina e da hidrogenase; com isso, não há produção de H<sub>2</sub>, acetato e ATP (Kulda 1999; Rasolonson *et al.* 2002). A redução drástica no metabolismo desta organela provoca uma deficiência no crescimento destes parasitos. Devido à disfunção hidrogenossomal, ocorre uma diminuição da entrada de lactato nestas organelas, concomitante com uma maior produção de lactato em *T. vaginalis* e etanol em *T. foetus*. De fato, o balanço metabólico de uma cepa de *T. vaginalis* que apresenta resistência ao metronizadol completamente desenvolvida mostrou que mais de 92% da glicose é convertida em lactato (Cerkasovová *et al.* 1984) e outro trabalho demonstrou que a atividade da enzima da lactato desidrogenase aumenta, alcançando valores sete vezes maiores do que em cepas não resistentes (Rasolonson *et al.* 2002).

As falhas terapêuticas associadas ao uso do metronidazol são reportadas há muito tempo (Watt e Jennison 1960). As taxas relatadas de resistência ao metronizadol entre mulheres variam de 2,2 a 9,6%. Em geral, a repetição do tratamento com a mesma dose ou em doses mais altas são suficientes (Kissinger 2015), porém isolados que apresentam resistência são comuns. Um estudo de genotipagem e resistência ao metronizadol de 20 isolados de *T. vaginalis* de pacientes de uma comunidade em Papua Nova Guiné revelou valores extremamente altos de resistência (17,4% dos isolados exibindo resistência). Estes isolados foram analisados e observou-se ainda uma população homogênea de *T. vaginalis*. Por isso, o monitoramento desta região é importante para o estudo da propagação de cepas resistentes (Upcroft *et al.* 2009).

A resistência ao medicamento ocorre por duas vias distintas: a resistência aeróbica e anaeróbica. Na resistência aeróbica, as vias de remoção de oxigênio estão diminuídas, levando a níveis de oxigênio intracelular aumentados. O oxigênio interfere com o processo de redução do metronizadol impedindo sua ativação. No caso da resistência anaeróbica, comumente induzida *in vitro*, ocorre uma redução da atividade de enzimas hidrogenossomais, como destacado anteriormente (Petrin *et al.* 1998; Cudmore *et al.* 2004). O conceito de que a resistência aeróbica ocorre apenas em pacientes infectados e que a resistência anaeróbica só pode ser obtida no laboratório não é mais aceito. Uma cepa isolada na Austrália que apresentava resistência ao metronidazol, quando testada anaerobicamente também foi resistente.

Em outro caso, duas cepas isoladas suscetíveis quando em condições anaeróbicas apresentaram resistência. Estes dados sugerem que existe mais de uma rota para a resistência (Upcroft e Upcroft 2001).

### 1.1.5 Mecanismos de patogenicidade

No trato urogenital feminino, diversos fatores como limitação de nutrientes, a resposta imune do hospedeiro e a microbiota vaginal, além de alterações fisiológicas durante o ciclo menstrual constituem importantes obstáculos para a sobrevivência do parasito (Petrin et al. 1998; Hirt 2013; Hernandez et al. 2014). Assim, *T. vaginalis* apresenta vários mecanismos para estabelecer, manter e modular a infecção no trato urogenital: (i) ligação e degradação dos componentes do muco e da matriz extracelular; (ii) ligação às células hospedeiras; (iii) citotoxicidade às células do sistema imune, tais como neutrófilos; (iv) fagocitose das bactérias vaginais e das células hospedeiras (células epiteliais, eritrócitos e células imunes); (v) degradação de anticorpos IgG e IgA.

Para entrar em contato com as células do epitélio vaginal, o parasito deve ultrapassar a barreira de muco. Para atravessar esta barreira, primeiro ocorre a ligação (possivelmente através de uma adesina tipo lectina), posteriormente a degradação proteolítica (ação de mucinases) e finalmente, dada mobilidade apresentada por estes protozoários, ocorre sua passagem e colonização das células epiteliais subjacentes (Lehker e Sweeney 1999).

Em contato com as células hospedeiras, o parasito passa por uma mudança morfológica, assumindo a forma ameboide. Esta alteração morfológica é essencial para maximizar a superfície de contato à célula hospedeira (De Jesus et al. 2009; Hirt 2013). Os microfilamentos participam deste processo induzindo o rearranjo do citoesqueleto. Por isso, há uma regulação positiva da actina e de genes associados a ela após o contato com células epiteliais vaginais (VECs). A  $\alpha$ -actinina, por exemplo, além da regulação positiva apresenta alteração na sua distribuição; enquanto que a fimbrina (*TvFim1*), não é regulada, mas também apresenta alteração na sua distribuição, formando clusteres (Kusdian et al. 2013). Os autores demonstram também que o rearranjo dos microfilamentos possui papel importante durante a fagocitose de diversos organismos (Kusdian et al. 2013).

Sobre a especificidade às células hospedeiras, foi demonstrado que *T. vaginalis* adere menos que *T. foetus* às células do epitélio vaginal de bovinos (BVECs), além disso, foi incapaz de causar danos às BVECs (Singh et al. 1999).

Outro trabalho demonstrou que *T. vaginalis* apresentou uma proporção aumentada de adesão e citotoxicidade às células epiteliais em comparação com fibroblastos (Alderete e Garza 1985). Porém outros estudos mostraram que as tricomonas são capazes de se conectar a substratos como laminina, fibronectina e colágeno, que são componentes conhecidos da matriz extracelular e da membrana basal (Costa e Silva-Filho et al. 1988, Benchimol et al. 1990, Crouch e Alderete 1999, Alvarez-Sánchez et al. 2000). Recentemente, foi demonstrado que *T. vaginalis* é capaz de provocar efeitos citotóxicos em cultura primária de oviduto bovino (Midlej e Benchimol 2010).

Várias moléculas participam do processo de adesão às células hospedeiras. Dentre elas, podemos destacar um lipofosfoglicano (LPG) que se liga à galectina-1 em células de mamíferos. Estudos demonstraram que a alteração destas moléculas em células mutantes apresentou redução tanto na adesão quanto na citotoxicidade (Bastida-Corcuera et al. 2005). Porém, o nocaute da galectina-1 não é suficiente para impedir a adesão do parasito (Okumura et al. 2008), sugerindo o envolvimento de outras moléculas.

Algumas enzimas apresentam, além de suas funções metabólicas, funções não enzimáticas em outros processos biológicos. Estas proteínas com dupla função já foram descritas em eucariotos e procariotos e são denominadas proteínas “moonlight” (Collingridge et al. 2010). Estas enzimas estão localizadas em mais de um compartimento celular desempenhando diferentes funções em cada um destes. Em *T. vaginalis*, as adesinas (AP) foram descritas participando da via glicolítica e na superfície celular, mesmo não apresentando um peptídeo sinal (Moreno-Brito et al. 2005; Meza-Cervantez et al. 2011). Foi demonstrado ainda que as adesinas AP65, AP51, AP33 e AP23 não são específicas na adesão às VECs e participam do processo de interação com outras linhagens celulares como HeLa, Vero e *Mycoplasma hominis*. Estes autores sugerem que a especificidade ao hospedeiro e tecido da adesão não ocorre devido à especificidade destas adesinas (Addis et al. 2000). Outro trabalho mostrou que as proteínas AP51 e AP65, além de atuarem como moléculas de adesão, também poderiam atuar como proteínas de ligação ao grupamento heme e à hemoglobina (Ardalan et al. 2009).

*Trichomonas vaginalis* exerce um efeito citotóxico nas células epiteliais mediada tanto por mecanismos dependente e independente de contato. Um dos fatores solúveis liberados pelo parasito em contato com as células é uma glicoproteína de 200 kDa, conhecida como *cell-detaching factor* (CDF), que promove

o desprendimento celular (Garber e Lemchuk-Favel 1990). A atividade de CDF é um importante fator na patogênese, uma vez que *Pentatrichomonas hominis*, uma espécie não patogênica, não possui atividade de CDF (Garber et al. 1989).

As proteases estão envolvidas em diversos processos celulares e também desempenham um importante papel na virulência. Dentre elas, as cisteína proteases (CP) são amplamente caracterizadas em *T. vaginalis* desempenhando diversas funções como: (i) evasão do sistema imune, degradando anticorpos IgA e IgG; (ii) indução de apoptose em células epiteliais vaginais; (iii) degradação de componentes da matriz extracelular; (iv) participação do processo de adesão celular e citotoxicidade; (v) participação do processo de hemólise (Provenzano e Alderete 1995; Lehker e Sweeney 1999; Alvarez-Sanchez et al. 2000; Mendoza-Lopez et al. 2000; Hernández-Gutiérrez et al. 2003, 2004; Sommer et al. 2005; De Jesus et al. 2009; Hernandez et al. 2014). A síntese e a atividade destas proteases são moduladas por fatores ambientais como pH, temperatura, poliaminas e ferro (Hernandez-Gutierrez et al. 2003; De Jesus et al. 2009). A lise de eritrócitos durante a menstruação e a consequente aquisição do ferro é responsável pelo aumento da densidade de parasitos e exacerbação dos sintomas da TUH durante e após o período menstrual (Lehker et al. 1990). Adicionalmente, este elemento está relacionado com a regulação em nível transcricional e pós-transcricional de vários genes (Horváthová et al. 2012, Beltrán et al. 2013, Figueroa-Angulo et al. 2015). Destaca-se também seu papel no metabolismo de carboidratos, uma vez que diversas proteínas hidrogenossomais apresentam muitas proteínas de ferro-enxofre [FeS]. Foi demonstrado que em *T. foetus* as principais proteínas ligadoras de ferro são as ferredoxinas [2Fe-2S] (Suchan et al. 2003).

A compreensão da interação de *T. vaginalis* com o hospedeiro deve levar em consideração a capacidade do parasito de interagir com a microbiota vaginal. Estudos demonstraram a sua capacidade de fagocitar bactérias e leveduras (Pereira-Neves e Benchimol 2007; Rendon-Maldonado et al. 1998). As espécies do gênero *Lactobacillus* produzem ácido láctico na vagina reduzindo o pH vaginal, e geram compostos bactericidas e bacteriostáticos competindo com outros patógenos oportunistas. Estas bactérias são fundamentais na prevenção de infecções urogenitais. Isso explicaria a correlação entre pacientes infectados por *T. vaginalis* e uma baixa proporção de lactobacilos (Brotman et al. 2012).

Esta capacidade também é utilizada para englobar células do hospedeiro, incluindo células epiteliais vaginais e do sistema imune e, até mesmo,



espermatozoides (Benchimol et al. 2008; Midlej e Benchimol 2010; Rendon-Maldonado et al. 1998). Além disso, *T. vaginalis* é capaz de endocitar alguns vírus, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Rendon-Maldonado et al. 2003). Este seria um dos mecanismos para se explicar o aumento da susceptibilidade de transmissão do HIV em pacientes infectados com *T. vaginalis* (Carlton et al. 2010; Johnston e Mabey 2008). Este fenômeno da utilização do protozoário como cavalo de tróia pelos vírus seria possível uma vez que *T. vaginalis* apresenta simbioses intracelulares. O estudo de dois simbioses intracelulares, os vírus de dsRNA (TVV) e *Mycoplasma hominis*, no metabolismo e virulência do parasito, demonstra a importância desta relação para a biologia destes parasitos (Khoshnan e Alderete 1994; Vancini et al. 2008; Fürnkranz et al. 2018).

Trabalhos mais recentes têm demonstrado o papel dos exossomos, pequenas vesículas formadas nos corpos multivesiculares e liberadas após contato com célula hospedeira, que modulam a interação parasito-hospedeiro bem como a resposta imune às células hospedeiras (Twu et al. 2013; Nievas et al. 2017).

Os mecanismos utilizados por *T. vaginalis* para adesão e citotoxicidade são essenciais para compreender a interação do parasito e célula hospedeira, proporcionando um maior conhecimento da patogenicidade deste parasito e compreensão da infecção e desenvolvimento da doença no hospedeiro.

### **1.1.6 Tricomoníase**

A evolução da infecção por *T. vaginalis*, depende de diversos fatores associados ao hospedeiro como imunidade, estado nutricional e microbiota vaginal (Nelson et al. 2010; Ravel et al. 2011; Brotman et al. 2012), e ao parasito como as diferenças genéticas das cepas (de Miguel et al. 2010). Estudos comparativos entre diferentes cepas, incluindo cepas recém-isoladas e cepas mantidas em cultivo prolongado, são essenciais para identificar moléculas correlacionadas com fenótipos mais virulentos (Cuervo et al. 2008; de Miguel et al. 2010).

A TUH é a infecção sexualmente transmissível (IST) não viral mais comum no mundo. A Organização Mundial de Saúde estimou que, em 2008, havia 187 milhões de pessoas infectadas, com uma incidência aproximada de 276,4 milhões de novos casos (WHO, 2012). No Brasil, o Ministério da Saúde estima mais de 4,3 milhões de novos casos por ano. Estes dados não refletem necessariamente a realidade uma vez que a notificação não é obrigatória, assim, o número de casos pode ser ainda maior; e a infecção pode ser assintomática. Estima-se que um terço dos casos de

tricomoníase é assintomático em mulheres. Esta alta frequência de casos assintomáticos contribui diretamente para a disseminação da infecção. Além disso, durante o tratamento do indivíduo infectado, é recomendado o tratamento do parceiro, a fim de evitar os casos de persistência parasitária. Quando sintomáticas, as mulheres podem apresentar corrimento, irritação, odor e/ou prurido vaginal, além de inflamação na uretra, na vulva, na vagina ou no colo do útero. Homens são principalmente assintomáticos, sendo a infecção é auto-resolutiva (Petrin et al. 1998). Acredita-se que tal fenômeno ocorra pela presença de maiores quantidades de zinco, o que impediria a colonização do trato urogenital masculino por *T. vaginalis*. (Hirt 2013; Kissinger 2015).

Dentre as consequências da TUH é possível destacar vaginite, uretrite, prostatite, neonatos de baixo peso e ruptura prematura de membranas e infertilidade (Swygard et al. 2004; Kissinger 2015). A infecção por *T. vaginalis* é um importante cofator na amplificação da transmissão do HIV (McClelland et al. 2007, Van Der Pol et al. 2008). De fato, o tratamento da TUH poderia contribuir na redução da incidência da infecção pelo HIV (Sorvillo e Kerndt 1998; Upcroft et al. 2009). Além disso, diversos trabalhos têm correlacionado a infecção com o aumento do risco de câncer cervical e de próstata (Sutcliffe et al. 2012; Kissinger et al. 2015).

A sensibilidade da preparação a fresco para o diagnóstico é de 60%-70% e este valor pode diminuir para 20% se a observação atrasar mais de 10 minutos. A positividade do diagnóstico torna-se negativa após 10 minutos da leitura inicial e imediata. A fim de maximizar a sensibilidade deste teste amplamente utilizado, recomenda-se que todos os espécimes sejam examinados imediatamente após serem obtidos (Kingston et al. 2003).

O controle da tricomoníase depende do tratamento dos indivíduos infectados, sejam sintomáticos ou assintomáticos, bem como a educação pública baseada em programas de prevenção. No entanto, a resistência ao metronidazol é uma questão premente. Além de novas alternativas terapêuticas e o desenvolvimento de uma vacina, é essencial compreender os mecanismos de patogênese para desenvolver novas estratégias de controle da doença.

## 1.2 Genoma

O genoma de *T. vaginalis* (cepa G3) foi publicado em 2007 (Carlton et al. 2007). Esta cepa foi isolada de uma paciente na Inglaterra e foi escolhida pela sua

grande utilização em estudos, o que está intimamente associado ao sucesso adaptativo ao crescimento em meios de cultura axênico, bem como por não apresentar infecção com um dsRNA vírus como em outras cepas, e não possuir contaminação com *Mycoplasma hominis* (Carlton et al. 2010). Os dados do sequenciamento e análises posteriores mostraram que ele atinge 175 megabases de comprimento e pode codificar aproximadamente 46.000 proteínas (Carlton et al. 2007; Smith e Johnson 2011). É importante destacar que as repetições e os elementos transponíveis incluem cerca de dois terços do genoma (65%). Além disso, eventos de duplicação do genoma proporcionaram uma expansão em algumas famílias de genes (Carlton et al. 2007). Dentre estas famílias, estão as proteínas quinases (aproximadamente 880 genes que codificam proteínas quinases e aproximadamente 40 proteínas quinases atípicas constituindo um dos maiores grupos de eucariotos) e as peptidases (o degradoma de *T. vaginalis* que apresenta 439 peptidases). Dentre estas peptidases, estão as cisteína-peptidases, destacadas anteriormente como fundamentais na adesão e citotoxicidade (De Jesus et al. 2009; Hernandez et al. 2014). Análises do genoma também mostraram genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de lipopolissacarídeos (LPS). O LPS é o principal componente da superfície celular que forma um denso glicocálix envolvido na adesão às células epiteliais *in vitro* (Bastida-Corcuera et al. 2005). Esta cadeia polissacarídica contém vários monossacarídeos, entre eles, a ramanose. Este monossacarídeo está ausente em humanos e esta via biossintética pode constituir um importante alvo para desenvolvimento de drogas (Carlton et al. 2010).

*Tritrichomonas foetus* possui um genoma tão grande quanto o de *T. vaginalis*, com tamanho estimado de 177 megabases e organizado em cinco cromossomos (Xu et al. 1998, Zubáková et al. 2008). Em 2017, o genoma de *T. foetus* da cepa K foi sequenciado. Nas duas espécies, a abundância de repetições resultou em uma sequência altamente fragmentada, impedindo uma investigação da arquitetura do genoma (Benchimol et al. 2017). Além disso, estudos apontaram que esta expansão maciça do material genético é recente. Esta expansão, em conjunto com a formação de caminhos metabólicos que provavelmente se transmitiram através da transferência lateral de genes a partir de bactérias, a amplificação de famílias de genes específicas envolvidas na patogênese e a fagocitose das proteínas do hospedeiro podem exemplificar as adaptações do parasita durante sua transição para um ambiente urogenital (Carlton et al. 2007; Singh et al. 2012).

Um estudo mostrou uma grande diversidade genética em *T. vaginalis*. Esta diversidade implica em diferenças na sensibilidade ao metronidazol (Conrad et al. 2012). Por isso, a compreensão da genética populacional e da diversidade de *T. vaginalis* tem implicações para a epidemiologia e o controle da tricomoníase humana. É importante destacar que o desenvolvimento de uma vacina para tricomoníase depende de uma profunda compreensão da diversidade genética presente em *Trichomonas*, concentrando esforços em determinantes antigênicos que são amplamente representativos da população (Meade et al. 2009). A vacina para novilhos produz resposta imune contra *T. foetus* o que é eficaz na prevenção de infecções e na diminuição da taxa de aborto (Cobo et al. 2002). A semelhança entre *T. foetus* e *T. vaginalis* encoraja o desenvolvimento de uma vacina contra a tricomoníase humana, que apresenta um grande potencial de impactos financeiro, social e de saúde (Cudmore e Garber 2010).

Os trabalhos de transcriptoma e proteômica refletem a complexidade do genoma, uma vez que as diversas isoformas proteicas são expressas de forma distinta dependendo das condições ambientais (De Miguel et al. 2010, Gould et al. 2013, Horvathova et al. 2012; Huang et al. 2014; Kusdian e Gould 2014). Assim, as diferentes metodologias das abordagens genômica e proteômica podem ser fundamentais para elucidar fatores genéticos que estão envolvidos em manifestações clínicas e de resistência a drogas.

De forma geral, os estudos proteômicos foram impulsionados pelo aumento da disponibilidade de sequências de DNA, principalmente advindos de dados do sequenciamento do DNA genômico e sequências expressas, além dos aprimoramentos na técnica e, concomitantemente, o desenvolvimento de algoritmos computacionais para análise dos dados (Graves e Haystead 2002).

## **1.3 Proteômica**

### **1.3.1 Proteoma**

Para caracterizar as análises de expressão gênica focadas na proteína, Wilkins e colaboradores definiram o conceito de “Proteoma” como as proteínas codificadas por um determinado genoma. Diferentemente do genoma, o proteoma é dinâmico podendo variar em diferentes condições (Wilkins et al. 1995). Por isso, mesmo as análises transcricionais nem sempre refletem o conteúdo das proteínas

de uma célula, uma vez que o RNA mensageiro está sujeito ao controle pós-transcricional e as proteínas formadas estão sujeitas à modificação pós-tradução, além de serem reguladas por proteólise e compartimentalização (Graves e Haystead 2002). Para compreender o desafio do estudo das proteínas, trabalhos apontam que os 20.235 genes humanos codificam 100.000 formas de proteínas, por isso, identificar e compreender a função explícita de cada uma destas formas é um desafio hercúleo (Zhang et al. 2013). A discussão do conceito de proteoforma, que seriam as diferentes formas de uma proteína produzidas a partir do genoma com uma variedade de variações de sequência, isoformas por "splicing" alternativo e inúmeras modificações pós-traducionais, pode elevar ainda mais este número. A análise das proteoformas ficará cada vez mais simples à medida que as informações são acumuladas e arquivadas, e com certeza ajudará na identificação de marcadores-chave para diagnóstico e alvos terapêuticos de doenças humanas (Smith e Kelleher, 2018).

O objetivo da proteômica não é apenas identificar as proteínas em uma célula ou tecido, mas quantificá-las, estudando sua abundância diferencial em diferentes condições, bem como suas modificações pós-traducionais, localização e interações com as demais proteínas. A utilização da espectrometria de massas para o estudo de proteínas foi um passo importante, pois possibilitou o estudo de um conjunto de proteínas aliado à sensibilidade da análise e a precisão dos resultados de identificação. Este passo foi possível pelo desenvolvimento de técnicas brandas de ionização como a ionização por eletrospray (electrospray ionization, ESI), desenvolvida por Fenn e colaboradores (Fenn et al. 1989) e a ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI), desenvolvida por Koichi Tanaka e colaboradores (Tanaka et al. 1988). Agregado, os avanços na cromatografia líquida foram fundamentais para separação e identificação de peptídeos com alta sensibilidade em amostras biológicas complexas. Por fim, é necessário destacar o aprimoramento dos equipamentos e da bioinformática no desenvolvimento de softwares para análise dos dados de identificação e quantificação das proteínas em larga escala. Com isso, o estudo da dinâmica da abundância proteica pela espectrometria de massas permite uma melhor compreensão dos processos biológicos globais e a mudança em resposta aos diferentes estímulos. Estas análises em larga escala permitem, por exemplo, a identificação de 4.000 proteínas de levedura em uma hora (Hebert et al. 2014).

### 1.3.2 Abordagens proteômicas

As análises proteômicas apresentam duas abordagens: “top-down proteomics” e “bottom-up proteomics”. Na proteômica “top-down”, as proteínas intactas são analisadas. Assim, a espectrometria de massa analisa tanto os íons intactos quanto os fragmentos gerados. Esta abordagem permite a obtenção de toda sequência proteica, possibilitando a caracterização completa de proteoformas, ou seja, a determinação de variações genéticas, splicing alternativo e modificações pós-traducionais. Apresenta uma limitação no tamanho das proteínas analisadas, até 200 kDa, devido à dificuldades com fracionamento protéico, ionização e fragmentação na fase gasosa (Zhang et al. 2013; Catherman et al. 2014). Enquanto na proteômica “bottom-up”, a abordagem mais utilizada nos estudos proteômicos atualmente, as proteínas são digeridas em peptídeos que serão ionizados e analisados no espectrômetro de massas. A identificação das proteínas é realizada através da atribuição de sequências de peptídeos aquela determinada proteína. Uma limitação é que os peptídeos podem ser compartilhados por mais de uma proteína, portanto, as proteínas identificadas são agrupadas com base nos peptídeos (Zhang et al. 2013).

Destas, a abordagem mais utilizada é a proteômica “bottom-up”. Para identificação dos peptídeos é necessário fazer a análise em tandem (MS / MS). Os peptídeos ionizados formam um espectro de íons precursores (MS1). Os íons selecionados sofrem fragmentação e são analisados formando MS2, que produz um fragmento de espectro de íons para cada íon precursor. A correspondência espectro-peptídeo (PSM) é estratégia considerada o padrão-ouro para identificação dos peptídeos. Estes espectros de fragmentos são comparados com a base de dados de sequências proteicas. Essa é a metodologia com maior sensibilidade, porém exige que bancos de dados de sequências proteicas estejam disponíveis. Além do PSM, o sequenciamento de novo (de novo sequencing) é utilizado para análises em que o organismo estudado não possui sequências de proteínas depositadas em banco de dados. Nesta abordagem são gerados grafos de possíveis sequências de aminoácidos com o objetivo de assinalar a sequência proteica mais adequada (Leprevost et al. 2014).

Adicionalmente, os estudos proteômicos “bottom-up” podem ser divididos em duas categorias: a proteômica de descoberta (discovery proteomics) e proteômica direcionada (targeted proteomics). Na estratégia baseada em descoberta, o objetivo é identificar o maior número de proteínas possível, enquanto que em experimentos

de proteômica direcionada o intuito é monitorar algumas proteínas de interesse com alta sensibilidade, reprodutibilidade e precisão quantitativa (Doerr 2013). A lista de proteínas-alvo pode ser escolhida a partir de candidatos a biomarcadores encontrados em um experimento de proteômica de descoberta ou ainda pelo interesse prévio em uma determinada via metabólica ou rede de interação a partir de análises computacionais (Ebhardt et al. 2015).

As duas principais estratégias para preparação de proteínas para as análises “bottom-up” são a digestão em gel (‘in-gel digestion’) e digestão em solução (in-solution digestion). Na digestão em gel, as proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), são digeridas com tripsina nos próprios pedaços do gel. Já na digestão em solução, não é utilizado detergente, mas fortes reagentes caotrópicos como uréia e tiouréia para extração das proteínas e posterior digestão de proteínas em solução. Em um método mais recente, a preparação das proteínas é auxiliada por filtro (filter-aided sample preparation - FASP). A amostra é solubilizada em SDS a 2%, um detergente extremamente eficaz na solubilização de proteínas, e então retida e concentrada na coluna. O filtro atua como um ‘reator proteômico’ para todas etapas do processamento, remoção do detergente, troca de tampão, modificação química e digestão protéica (Wiśniewski et al. 2009). Este método permite a depleção eficiente do SDS e a digestão de proteínas. Além disso, o princípio do reator proporciona a clivagem proteica por etapas e a utilização de mais de uma enzima. Foi observado que o uso consecutivo da lisil-endopeptidase (LEP) e tripsina permitiu a identificação de um número maior de proteínas (até 40% mais) e sítios de fosforilação em comparação com a digestão apenas com tripsina. Adicionalmente, foi demonstrado que os peptídeos gerados apresentam uma quantidade muito baixa de clivagens perdidas (1 a 1,5%). Este resultado deve-se às condições proporcionadas pela digestão com o filtro que permite que a digestão ocorra na ausência de substâncias caotrópicas, como a uréia e um pH de 8,5 que é ideal para atividade das enzimas (LEP e tripsina) (Wiśniewski et al. 2009; Wiśniewski e Rakus 2014). Este método utilizando filtro tem sido aprimorado pelo grupo que o desenvolveu e por outros autores que propõem um FASP aprimorado, em que alguns reagentes são substituídos com intuito de melhorar a sensibilidade, recuperação e cobertura proteômica das amostras processadas (Erde et al. 2014).

### 1.3.3 Proteômica quantitativa

Com o avanço da espectrometria de massa (MS) aplicada ao estudo das proteínas, atualmente é possível identificar e quantificar milhares de proteínas com precisão. A quantificação pode ser relativa ou absoluta. A quantificação relativa permite que as abundâncias relativas de proteína sejam comparadas entre diferentes condições e com isso caracterizar a dinâmica do proteoma nestes sistemas celulares (Arike et al. 2012). Entre os métodos estão (i) a marcação metabólica como o SILAC (marcação isotópica estável por aminoácidos em culturas de células). O SILAC é uma marcação isotópica *in vivo* em que  $^{13}\text{C}_6$ -lisina e/ou  $^{13}\text{C}_6$ -arginina é adicionada ao meio de cultura para o crescimento celular (Ong et al. 2002). As amostras marcadas são misturadas antes da preparação para a análise por espectrometria de massas, o que contribui para diminuir o viés devido aos erros de processamento da amostra. Esta técnica apresenta restrições como linhagens celulares que não crescem ou apresentam dificuldades devido às mudanças na composição do meio de cultura; (ii) a marcação química com kits comerciais como o iTRAQ (marcação isobárica para quantificação relativa e absoluta) que apresenta uma etiqueta isobárica “isobaric tag”. A análise em tandem (MS/MS) é necessária para detectar as tags isobáricas, que são quantificadas, resultando na identificação do peptídeo e quantificação relativa entre as amostras. É importante destacar que peptídeos não marcados em todas as condições analisadas não podem ser quantificados. Estas técnicas utilizam kits comerciais caros e apresentam limitação no número de condições a serem comparadas; (iii) diversos métodos sem marcação (label-free) para quantificação relativa como cromatograma de íon extraído (XIC), em que a intensidade do íon precursor ao longo do tempo é usada como comparação com outros XIC's do mesmo peptídeo em amostras diferentes e comparação do número espectros de MS2 adquiridos “spectral counts” para uma determinada proteína nas diferentes amostras (Washburn et al. 2001; Wiener et al. 2004).

Já a quantificação absoluta possibilita uma compreensão quantitativa e abrangente do metabolismo celular ou de um determinado tecido. Além disso, permite uma modelagem matemática em biologia de sistemas. Esta informação da concentração intracelular absoluta da proteína permite, por exemplo, avaliar o custo de uma determinada via metabólica ativa (Arike et al. 2012). Os métodos *label-free* podem ser usados para quantificação absoluta. Diversos métodos foram desenvolvidos e dividem-se em duas classes (i) baseados nos íons precursores,



como “Top 3 Protein Quantification” (T3PQ), em que as intensidades dos íons referentes aos peptídeos das três proteínas mais abundantes são analisadas; e (ii) baseados nas análises em tandem (MS/MS) como o índice de abundância proteica exponencialmente modificado, “exponentially modified protein abundance index” (emPAI) em que o cálculo baseia-se no número de peptídeos detectados e o número de peptídeos tripticos teoricamente observados (Ishihama et al., 2005); e a expressão proteica absoluta “absolute protein expression” (APEX), que leva em consideração o número de espectros e usa um fator de correção para calcular a abundância baseada no número de peptídeos observados (Lu et al. 2007).

Em métodos de quantificação absoluta, padrões marcados com isótopos, em geral peptídeos com concentração conhecida, são adicionados às amostras antes de injetá-las no espectrômetro de massas. Atualmente, abordagens que não utilizam estes padrões, mas apresentam resultados similares, diminuem o custo e aumentam a praticidade da técnica. Os métodos como APEX e emPAI, assumem que todas as proteínas que contribuem para o conteúdo proteico da amostra são identificadas e quantificadas. Estas abordagens realizam o cálculo da quantificação absoluta a partir da fração de cada proteína no conjunto proteico total (Cox et al. 2014). A quantificação sem marcação apresenta alguns desafios como a variabilidade da manipulação da amostra, que deve ser mitigada quando as amostras são processadas em períodos distintos, em diferentes espectrômetros ou em laboratórios diferentes. A padronização do equipamento, simplificação dos procedimentos na preparação de amostras e automação usando sistemas robotizados são possíveis soluções. Além disso, as aplicações que exigem robustez extrema, como o manuseio da amostra em uma configuração clínica, provavelmente se beneficiarão de peptídeos marcados com concentração definida que servem como padrões internos (Cox et al. 2014).

A análise proteômica sem marcação combinada com uma abordagem de proteína total (TPA) permite a determinação das concentrações de milhares de proteínas (Wiśniewski e Mann 2016). O TPA é um método sem marcação e sem necessidade de um padrão (standard-free) que utiliza dados de larga escala de proteômica para quantificação absoluta das proteínas. O método assume que os sinais dos espectros de uma determinada proteína corresponde a sua abundância na amostra analisada. Foi demonstrado que a quantificação é similar aos métodos que utilizam marcação (Wiśniewski et al. 2012). Em seguida, o “Proteomic Ruler”, que seria uma régua proteômica, pode ser utilizado para estipular o número de

cópias de proteínas por célula. O sinal MS derivado das histonas identificadas em uma amostra, pode ser usado como um padrão natural para estimar as quantidades totais de proteína por célula (Wiśniewski et al. 2014). É importante destacar que o TPA só pode ser utilizado para análises de larga escala, uma vez que, em amostras menos complexas e com poucas proteínas identificadas, haverá uma menor quantidade de peptídeos para calcular a abundância proteica, o que poderá trazer distorções no valor calculado (Wiśniewski et al. 2012; 2014).

Como descrito acima e agora em maior detalhe, no cálculo da abordagem de proteína total (TPA), a quantidade de uma proteína individual é calculada como a proporção de sua intensidade (sinal dos espectros de massas de determinada proteína) em relação ao total das intensidades na amostra analisada (sinal dos espectros de massas de todas as proteínas):

$$\text{proteína total (i)} = \frac{\text{sinal dos espectros da proteína}}{\text{sinal dos espectros totais da amostra}}$$

Este valor também pode ser expresso em porcentagem da proteína na amostra:

$$\% \text{ proteína total (i)} = \frac{\text{sinal dos espectros da proteína (i)}}{\text{sinal dos espectros totais da amostra}} \times 100\%$$

Esta quantidade de proteína total pode ser convertida em concentração da proteína:

$$\text{Concentração da proteína (i)} = \frac{\text{sinal dos espectros da proteína}}{\text{sinal dos espectros totais da amostra} \times \text{peso molecular (i)}} \left[ \frac{\text{mol}}{\text{g total proteína}} \right]$$

Posteriormente, o conteúdo total proteico de uma única célula pode ser calculado como:

$$\text{Proteína total / célula} = \frac{\text{peso 2n DNA [pg]} \times \text{sinal dos espectros totais [pg]}}{\text{sinal dos espectros das histonas}}$$

Por fim, para calcular o número de cópias de proteínas por célula:

$$\text{Número de cópias de proteínas por célula} = N_A \times \frac{\text{peso 2n DNA[pg]} \times \text{ sinal do espectro total}}{\text{ sinal dos espectros das histonas} \times \text{ peso molecular } (i)}$$

onde  $N_A$  é a constante de Avogadro

### 1.3.4 Estudos proteômicos de *Trichomonas vaginalis*

Os primeiros estudos proteômicos em *T. vaginalis* utilizaram a combinação de separação proteica por eletroforese bidimensional e identificação das proteínas utilizando MALDI-TOF/TOF (De Jesus et al. 2007a; De Jesus et al. 2007b; Cuervo et al. 2008; Huang et al. 2009; Huang et al. 2012). O objetivo destes trabalhos foi obter um mapa proteico do parasito (De Jesus et al. 2007b; Huang et al. 2009) ou processar os spots diferenciais para identificação de variações nas proteínas entre as duas condições, como parasitos cultivados na presença ou ausência do ferro; em diferentes cepas de *T. vaginalis*; e em parasitos antes e após a adesão à fibronectina (De Jesus et al. 2007a; Cuervo et al. 2008; Huang et al. 2012). No entanto, a eletroforese em gel bidimensional (2DE) usada para separar as proteínas apresenta limitações, entre elas, o fato de não resolver totalmente proteínas de membrana, proteínas de baixa abundância, proteínas com valores de pI extremos e proteínas muito pequenas ou muito grandes (Nägele et al. 2004).

Posteriormente, vários estudos de subproteomas foram realizados com intuito de estudar processos biológicos específicos (de Miguel et al. 2010; Twu et al. 2013; Schneider et al. 2011; Rada et al. 2011; Beltran et al. 2013; Nievas et al. 2017; Štáfková et al. 2018). Miguel e colaboradores (2010) realizaram uma análise proteômica da superfície da membrana plasmática de seis cepas de *T. vaginalis* que apresentavam diferentes capacidades de adesão às células epiteliais vaginais, identificaram 411 proteínas, sendo 11 destas mais abundantes em cepas mais aderentes. Dentre estas proteínas, duas proteínas não caracterizadas (TVAG\_244130 e TVAG\_166850, foram superexpressas em cepas com menor capacidade de adesão, e foi possível observar um aumento de duas vezes na adesão à células do epitélio vaginal destes parasitos transfectados (de Miguel et al. 2010). Estes resultados mostram a necessidade de mais estudos para elucidar moléculas essenciais na adesão de *T. vaginalis*. Neste caso, a proteômica foi fundamental para uma melhor compreensão de mecanismos moleculares utilizados na interação com o hospedeiro e das diferenças entre as diferentes cepas, o que

pode explicar variações nos sintomas e a progressão da doença (de Miguel et al. 2010).

As análises proteômicas dos hidrogenossomos permitiram a identificação de 575 proteínas (Schneider et al. 2011; Rada et al. 2011; Beltran et al. 2013). As proteínas hidrogenossomais são codificadas no núcleo celular e importadas para as organelas. Assim, estes trabalhos elucidaram importantes componentes estruturais, mecanismos para importação de proteínas, vias metabólicas e processos de formação de proteínas [FeS]. Beltran e colaboradores (2013) investigaram as proteínas hidrogenossomais que apresentaram diferenças em parasitos cultivados em meio com depleção de ferro. Das 179 proteínas identificadas, 58 estavam diferencialmente abundantes. A depleção de ferro provocou aumento na abundância de proteínas envolvidas na montagem das proteínas [FeS] e diminuição de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos. É importante destacar que o ferro não afetou a expressão de todos os parálogos das proteínas identificadas da mesma forma (Beltran et al. 2013).

Trabalhos proteômicos de vesículas extracelulares em *T. vaginalis* foram importantes para elucidar seu conteúdo e demonstrar seu papel na interação com as células hospedeiras (Twu et al. 2013; Nievas et al. 2017). Foi demonstrado que as estruturas tipo microvesículas apresentam propriedades físicas e bioquímicas semelhantes às de mamíferos. Proteínas centrais são conservadas entre *T. vaginalis* e mamíferos, porém proteínas exclusivas do protozoário também foram identificadas (Nievas et al. 2017). Nos exossomos estão proteínas de sinalização, enzimas metabólicas, proteínas de vácuolos, citoesqueleto e transporte (Twu et al. 2013). Foi demonstrado que os exossomos medeiam as interações entre parasito e hospedeiro desempenhando um papel importante na adesão às células epiteliais. Os exossomos de cepas mais aderentes aumentaram a adesão de parasitas menos aderentes às células epiteliais vaginais e prostáticas. Além disso, modulam a resposta imune das células hospedeiras (Twu et al. 2013).

Recentemente, um trabalho identificou 2072 proteínas secretadas (Štáfková et al. 2018). Destas, 89 proteínas com maiores evidências de serem secretadas foram classificadas em 13 categorias funcionais, e incluem principalmente adesinas, metalopeptidases, proteínas formadoras de poros e  $\beta$ -amilases. Devido às dificuldades de prever as proteínas secretadas por ferramentas de bioinformática, os autores utilizam as  $\beta$ -amilases como modelo para investigar a via secretora de *T. vaginalis* (Štáfková et al. 2018).

Tais publicações demonstram que as abordagens proteômicas constituem uma estratégia importante para auxiliar na compreensão da biologia de *T. vaginalis*.

## 1.4 Justificativa

Vários trabalhos sobre pseudocistos em tricomonadídeos corroboraram o fato de que estas formas são viáveis e reversíveis. O conhecimento sobre a biologia da formação de pseudocistos é importante não apenas para entender melhor o ciclo de vida de *T. vaginalis*, mas também para compreender seu papel na dinâmica da transmissão do parasito. Nesse sentido, o modelo de indução de pseudocisto de *T. vaginalis*, desenvolvido pelo nosso grupo através da depleção de ferro, representa uma importante ferramenta para se estudar a organização ultraestrutural, adesão, as vias de sinalização e mecanismos de sobrevivência do parasito. A correlação das variações na abundância proteica com os possíveis mecanismos associados à transformação de trofozoítos em pseudocistos permitiu algumas conclusões prévias, não obstante necessitem de experimentações específicas a fim de serem mais bem suportadas. Os pseudocistos teriam uma grande importância epidemiológica, visto que facilitariam a transmissão da doença, além de induzir a diagnósticos falso-negativos durante as análises laboratoriais a fresco de espécimes clínicos, pois nesses exames a atenção do técnico laboratorista está voltada para a detecção de formas de trofozoítos móveis e não para formas esféricas e sem motilidade, como os pseudocistos. Postulamos também que, além do seu potencial envolvimento na transmissão, estas formas podem ter um papel importante na resistência aos derivados 5-nitroimidazóis, que são os medicamentos de primeira linha no tratamento da TUH, e no número de casos de falha ao tratamento, que aumentaram de forma alarmante nos últimos anos. Assim, visto que foi demonstrado que pseudocisto ocorre naturalmente no hospedeiro; e nossos resultados mostram que esta forma apresenta o metabolismo energético alterado, este poderia ser a forma que resistiria ao tratamento com os derivados nitroimidazóis, dado que a droga tem de ser metabolizada no hidrogenossomo para produzir a forma molecular ativa contra o parasito.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar a dinâmica dos processos biológicos envolvidos na formação de pseudocistos induzidos pela depleção de ferro.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Verificar as alterações estruturais e ultraestruturais em pseudocistos de *T. vaginalis* induzidos pelo cultivo em meio depletado de ferro;
- Analisar o processo de interação de trofozoítos e pseudocistos de *T. vaginalis* com células epiteliais;
- Analisar as mudanças na abundância de proteínas em pseudocistos em relação aos trofozoítos.

### **3 ARTIGO 1**

#### **3.1 Estado da arte**

- Pseudocistos são observados em tricomonadídeos (Lipman et al. 1999; Granger et al. 2000; Pereira-Neves et al. 2003; 2011; 2012; Costa e Benchimol 2004; Ribeiro et al. 2015; Castro 2016);

- Pseudocistos são observados principalmente sob condições de estresse e em baixa proporção, sob condições de cultura axênicas (Pereira-Neves et al. 2003);

- Pseudocistos de *T. foetus* induzidos pela depleção de ferro são formas viáveis e reversíveis (Castro et al. 2016);

- Pseudocistos de *T. vaginalis* foram observados em pacientes com câncer cervical (Afzan e Suresh 2012);

- O ferro desempenha papel fundamental em diversos processos como no crescimento, virulência, expressão de diversas proteínas, além disso, está envolvido na manutenção da morfologia de trofozoíto em *T. vaginalis* (De Jesus et al. 2007a).

#### **3.2 Questões propostas no trabalho**

Investigar os efeitos da depleção de ferro na dinâmica da formação de pseudocistos e na caracterização morfológica destes pseudocistos por microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão bem como a interação com células epiteliais humanas (HeLa e VEC).

#### **3.3 Resultados e contribuições para a área de estudo**

A aplicação das metodologias acima elencadas permitiria acompanhar o efeito da depleção do ferro nas alterações morfológicas dos trofozoítos replicativos em pseudocistos, formas arredondadas, não multiplicativas e sem motilidade. Além disso, os ensaios de reversibilidade corroboraram que os pseudocistos induzidos pela depleção de ferro são formas viáveis e reversíveis. Finalmente, os ensaios de adesão permitiram avaliar a capacidade de interação destas formas com células epiteliais humanas. Os resultados deste manuscrito sugerem que os pseudocistos

são induzidos como uma resposta ao estresse nutricional de ferro e poderiam ter um papel potencial na transmissão e infecção de *T. vaginalis*.

### **3.4 Morphologic study of the effect of iron on pseudocyst formation in *Trichomonas vaginalis* and its interaction with human epithelial cells**



# Morphologic study of the effect of iron on pseudocyst formation in *Trichomonas vaginalis* and its interaction with human epithelial cells

Geovane Dias-Lopes<sup>1</sup>, Leonardo Saboia-Vahia<sup>2</sup>, Eliane Trindade Margotti<sup>3</sup>,  
Nilma de Souza Fernandes<sup>3</sup>, Cássia Luana de Faria Castro<sup>4</sup>,  
Francisco Odencio Oliveira-Junior<sup>5</sup>, Juliana Figueiredo Peixoto<sup>1</sup>, Constança Britto<sup>1</sup>,  
Fernando Costa e Silva-Filho<sup>6</sup>, Patricia Cuervo<sup>2</sup>, José Batista de Jesus<sup>1,3/+</sup>

<sup>1</sup>Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Federal de São João Del Rei, Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina, São João Del Rei, MG, Brasil

<sup>4</sup>Instituto de Ensino Superior Presidente Tancredo de Almeida Neves, São João Del Rei, MG, Brasil

<sup>5</sup>Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Ultraestrutura Celular, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>6</sup>Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**BACKGROUND** *Trichomonas vaginalis* is the aetiological agent of human trichomoniasis, which is one of the most prevalent sexually transmitted diseases in humans. Iron is an important element for the survival of this parasite and the colonisation of the host urogenital tract.

**OBJECTIVES** In this study, we investigated the effects of iron on parasite proliferation in the dynamics of pseudocyst formation and morphologically characterised iron depletion-induced pseudocysts.

**METHODS** We performed structural and ultrastructural analyses using light microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy.

**FINDINGS** It was observed that iron depletion (i) interrupts the proliferation of *T. vaginalis*, (ii) induces morphological changes in typical multiplicative trophozoites to spherical non-proliferative, non-motile pseudocysts, and (iii) induces the arrest of cell division at different stages of the cell cycle; (iv) iron is the fundamental element for the maintenance of typical trophozoite morphology; (v) pseudocysts induced by iron depletion are viable and reversible forms; and, finally, (vi) we demonstrated that pseudocysts induced by iron depletion are able to interact with human epithelial cells maintaining their spherical forms.

**MAIN CONCLUSIONS** Together, these data suggest that pseudocysts could be induced as a response to iron nutritional stress and could have a potential role in the transmission and infection of *T. vaginalis*.

---

Key words: *Trichomonas vaginalis* - iron - pseudocyst - morphological transformation - trophozoites - human epithelial cells

---

*Trichomonas vaginalis* is the aetiological agent of human trichomoniasis, which is one of the most prevalent sexually transmitted infections in humans. Trichomoniasis affects over 270 million people worldwide, and 90% of these infections occur among people living in resource-limited settings (WHO 2012). Although *T. vaginalis* infection is a commonly curable disease and treatment is available at an affordable cost, the emergence of drug resistance and the lack of alternative treatments are increasing concerns among public health policy makers (Meites et al. 2015).

Infection with *T. vaginalis* is associated with increased susceptibility to human immunodeficiency virus, herpes virus and papillomavirus infection, cervical cancer and prostate cancer. Particularly in women, infection of the urogenital tract may lead to pre-term delivery, low-weight births and infertility (Kissinger 2015, Meites et al. 2015).

During their life cycle, trichomonads present a trophozoite form without a true cystic stage. However, the presence of spherical forms with internalised flagella, denominated pseudocysts or endoflagellar forms have been commonly found in these parasites (Lipman et al. 1999, Granger et al. 2000, Pereira-Neves et al. 2003, 2011, 2012, da Costa & Benchimol 2004, Ribeiro et al. 2015, Castro et al. 2016). Pseudocysts are observed mainly under unfavourable growth conditions and, at a low proportion, under *in vitro* axenic culture conditions (Pereira-Neves et al. 2003). In *Tritrichomonas foetus*, a trichomonad that infects the urogenital tract of cattle, pseudocysts induced by iron depletion are reversible and viable (Castro et al. 2016). In *T. vaginalis*, pseudocysts have been observed naturally in patients with cervical neoplasia (Afzan & Suresh 2012) or induced *in vitro* by iron depletion (de Jesus et al. 2007).

In parasitic trichomonads, iron participates in the following: (i) sustaining the parasite's growth (Lehker & Alderete 1992), (ii) modulating virulence (Kummer et al. 2008, Cárdenas-Guerra et al. 2013); (iii) hydro-genosomal metabolism via essential iron-sulfur [Fe-S] proteins (Vanáčová et al. 2001); (iv) regulating the expression of adhesins and cysteine peptidases involved

---

doi: 10.1590/0074-02760170032

Financial support: FAPERJ (JCNE E-26/201-545/2014), CNPq (Process nº 308679/2012-1, 306393/2014-0, 305589/2015-16).

+ Corresponding author: jbj@ufsj.edu.br Received

24 January 2017

Accepted 12 April 2017

in cytoadherence and cytotoxicity (Álvarez-Sánchez et al. 2007, Meza-Cervantez et al. 2011); (v) haemolysis (Cárdenas-Guerra et al. 2013); (vi) modulating the expression of ecto-ATPases and ecto-phosphatases (de Jesus et al. 2006); (vii) regulating Myb-like transcription factors (Hsu et al. 2012); (viii) inducing apoptosis in human epithelial cells (Kummer et al. 2008); and (ix) down-regulating the surface immunogen P270 (Alderete et al. 1999).

In previous studies, we observed that iron regulates protein expression in *T. vaginalis* and could be involved in the maintenance of the trophozoite morphology of this species (de Jesus et al. 2007). In the present study, we conducted a comprehensive morphologic analysis of the effect of iron on *T. vaginalis*. We used an approach that employs the removal of this metal from the culture medium by adding the iron chelator 2,2-dipyridyl. Thus, we investigated the effects of iron on parasite proliferation in the dynamics of pseudocyst formation and morphologically characterised the iron depletion-induced pseudocysts using structural and ultrastructural analyses by light microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. Furthermore, we evaluated the ability of the pseudocyst to interact with host cells and discussed the role of these forms in the life cycle of *T. vaginalis* and its relevance for the transmission and diagnosis of trichomoniasis.

#### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals** - All the reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) or Merck (São Paulo, SP, Brazil). Milli-Q-purified water (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) was used for all solutions. The iron chelator 2,2-dipyridyl is an organic, synthetic, membrane-permeable compound that associates with extracellular and intracellular iron (Breuer et al. 1995).

**Microorganisms and culture procedures** - The FMV1 strain of *T. vaginalis* (de Jesus et al. 2004) was cultivated at 37°C in trypticase yeast extract maltose medium (TYM), pH 6.3, supplemented with 10% heat-inactivated bovine serum and 0.6 mM FeSO<sub>4</sub> (standard TYM medium). For pseudocyst induction, parasites cultivated in standard TYM medium were collected at the logarithmic phase of growth by centrifugation at 1400 × g for 5 min at 4°C, washed twice with PBS, pH 7.2, and incubated at 37°C for 48 h in TYM medium, pH 6.3, supplemented with 10% heat-inactivated bovine serum and 180 µM 2,2-dipyridyl (TYM-DIP inducer medium). The parasite densities and/or morphotypes were estimated by counts in a haemocytometer. In all assays, parasite viability was estimated using the Trypan blue dye exclusion test (0.4% in sterile PBS). Parasite cultures with viability above 90% were used.

**Growth curve and effect of iron chelator on parasite proliferation** - To evaluate the influence of iron chelation on parasite proliferation, 1×10<sup>5</sup>/mL parasites were inoculated in 10 mL of standard TYM medium or TYM-DIP inducer medium and were incubated at 37°C for 72 h. The cellular density was evaluated daily by counting in a haemocytometer. Three independent assays were carried out in triplicate.

**Parasite morphotypes and light microscopy analysis** - The parasites were cultivated for 48 h at 37°C in standard TYM medium or TYM-DIP inducer medium. The counting of parasites morphotypes was performed every 12 h over 48 h in triplicate using a haemocytometer. For micrograph recording, the parasites cultivated in standard TYM medium or TYM-DIP inducer medium were harvested by centrifugation at 1400 × g for 5 min at 4°C, washed with PBS, pH 7.2, or PBS pH 7.2 containing 180 µM 2,2-dipyridyl (PBS-DIP), respectively, and fixed in 2.5% glutaraldehyde. The parasite morphotypes were observed and counted by differential interference contrast microscopy (DIC) or on slides stained with the Panotico LB kit® (Laborclin, Brazil). Spherical, non-proliferative, non-motile parasites with all flagella internalised were considered as typical pseudocysts.

**Analysis of the morphological reversibility of iron depletion-induced pseudocysts** - To evaluate whether iron depletion-induced pseudocysts are viable and reversible forms, the parasites cultivated for 48 h in TYM-DIP inducer medium were washed twice with PBS-DIP, inoculated in fresh standard TYM medium and incubated at 37°C for 24 h. Parasite morphology was examined by DIC, and the morphotypes were counted in a haemocytometer. Three independent assays were carried out in triplicate.

**Scanning electron microscopy analysis** - The parasites (1×10<sup>5</sup>/mL cells) were inoculated in standard TYM medium or TYM-DIP inducer medium for 48 h at 37°C. The parasites were then collected, washed and concentrated as described above, and a total of 5×10<sup>6</sup> parasites were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Na-cacodylate buffer (pH 7.2) at room temperature for 1 h at 25°C and post-fixed with a solution of 1% OsO<sub>4</sub>, 0.8% potassium ferricyanide and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> in the same buffer for 1 h at 25°C. The samples were dehydrated in an ascending acetone series and dried by the critical point method with CO<sub>2</sub>, mounted on aluminium stubs, coated with a 20-nm-thick gold layer and were examined with a Jeol JSM6390LV scanning electron microscope (Tokyo, Japan).

**Transmission electron microscopy analysis** - The parasites (1×10<sup>5</sup>/mL cells) were inoculated in standard TYM medium or TYM-DIP inducer medium for 48 h at 37°C. Thereafter, the parasites were collected, washed and concentrated as described above, and a total of 5×10<sup>6</sup> parasites were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Na-cacodylate buffer (pH 7.2) at room temperature for 40 min at 25°C and post-fixed with a solution of 1% OsO<sub>4</sub>, 0.8% potassium ferricyanide and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> in the same buffer for 20 min at 25°C. The parasites were then dehydrated in an ascending acetone series and were embedded in PolyBed 812 resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and were examined in a Jeol JEM1011 transmission electron microscope (Tokyo, Japan).

**Effect of FeSO<sub>4</sub> on iron depletion-induced pseudocysts** - To demonstrate that the maintenance of the typical pear-shaped trophozoite morphology of *T. vaginalis* is dependent on iron, the parasites were cultivated for 48 h in TYM-DIP inducer medium, and then, 1.2 mM FeSO<sub>4</sub> was added and incubated for an additional 24 h.

Next, the morphotypes were determined by counting with a 29

haemocytometer. Three independent assays were carried out in triplicate.

**Analysis of *T. vaginalis*-HeLa cell interactions by scanning electron microscopy** - HeLa cells (ATCC CCL-2.1 HeLa 229) were cultured in 24-well plates in RPMI medium supplemented with 10% bovine serum and maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> until confluence. Parasites cultivated in standard TYM medium or TYM-DIP inducer medium for 48 h at 37°C were submitted to interactions with a HeLa cell monolayer (5:1 parasites:HeLa cells) in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated bovine serum and containing or not containing 180 μM 2,2-dipyridyl. The interaction was allowed to proceed for 30 min at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. To quantify adhered parasites, after 30 min, the interaction assays were analysed using inverted phase-contrast microscopy with a 40X objective lens, and the percentage of adhered and non-adhered parasites was determined from counts of 400 parasites per well. Additionally, samples were fixed on slides and stained with the Panotico LB kit® to observe the morphology by light microscopy, or parasites were fixed and prepared for scanning electron microscopy analysis as described above.

**Analysis of *T. vaginalis*-VEC interactions by light microscopy** - Human vaginal epithelial cells (VECs) obtained from a young healthy donor were extensively washed with PBS pH 7.2 and resuspended in RPMI at 37°C. Parasites (1×10<sup>5</sup> cells) cultivated in 10 mL of standard TYM medium or TYM-DIP inducer medium were collected by centrifugation, washed in PBS or PBS-DIP, respectively, and then added to the VEC suspension in 500 μL RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated bovine serum and containing or not containing 180 μM 2,2-dipyridyl. The cell-parasite interaction was allowed to proceed for up to 30 min. To quantify adhered parasites, after the interaction, the cell suspension was homogenised and 50 μL was distributed in microscopy slides (10 in total) and covered with coverslips, and the number of adhered parasites was estimated by counting in 20 random fields in each slide using DIC microscopy. In addition, samples were fixed on slides and stained with the Panotico LB kit® to observe the morphology of adhered parasites using light microscopy.

## RESULTS

**Iron depletion inhibits *T. vaginalis* proliferation** - Comparison of the growth curves of *T. vaginalis* cultivated in standard TYM medium or TYM-DIP inducer medium for 72 h at 37°C showed that iron depletion inhibited parasite proliferation (Fig. 1). The parasites cultivated in standard TYM medium reached a log phase peak at 36 h with a maximum cell density of 1.7 × 10<sup>6</sup> cells/mL, followed by a strong decline in cell density (Fig. 1). In contrast, parasites cultivated in TYM-DIP inducer medium did not show significant growth but remained alive for up to 72 h.

**Light microscopy and ultrastructural analysis of the effect of iron depletion on the morphology of *T. vaginalis***

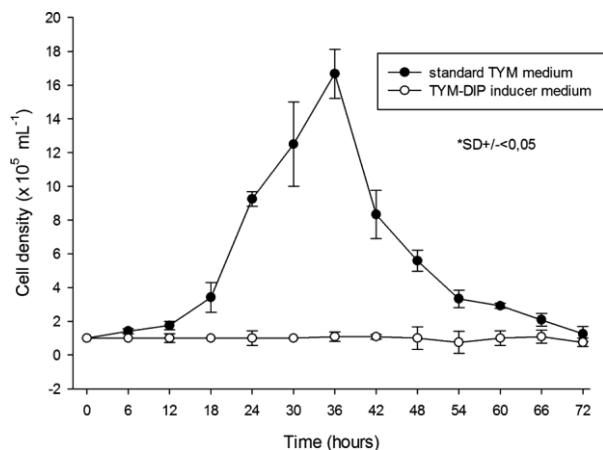


Fig. 1: effect of iron depletion on the cell growth of the *Trichomonas vaginalis* FMV-1 strain. Parasites were cultivated in standard TYM medium (filled circle) or TYM-DIP inducer medium (empty circle) for 72 h at 37°C. The parasites were counted every 6 h using a haemocytometer. The experiments were performed in triplicate, and the results are shown as medians ± SD.

**lis** - Differential interference contrast microscopy (DIC) micrographs of parasites cultivated in standard TYM medium for 48 h showed typical pear-shaped trophozoite forms with four anterior flagella and a recurrent flagellum, an axostyle and an eccentric nucleus (Fig. 2A). Hydrogenosomes were clearly observed along the cell body (Fig. 2A, E). The parasites cultivated for 48 h in TYM-DIP inducer medium exhibited typical spherical forms of different diameters, with flagella at the different stages of internalisation, slightly motile or non-motile (as observed previous to fixation), without a visible external axostyle (Fig. 2C). The process of flagellar internalisation of some cells seems to involve the internalisation of the recurrent flagellum first, followed by the anterior flagella. Typical spherical and non-motile pseudocysts with all internalised flagella were clearly observed (Fig. 2E).

Scanning electron microscopy of parasites cultivated in standard TYM medium for 48 h revealed typical trophozoites commonly found in axenic culture, exhibiting all anterior flagella and a recurrent flagellum associated with an undulant membrane (Fig. 2B). In contrast, parasites cultivated in TYM-DIP inducer medium for 48 h underwent a drastic morphological transformation from typical trophozoites to pseudocysts, which exhibit spherical forms, internalising anterior flagella and a recurrent flagellum (Fig. 2D, F). Some pseudocysts at different stages of flagella internalisation were also observed (Fig. 2D). Such observations were further corroborated by TEM analysis (Fig. 3). TEM clearly showed that parasites cultivated in TYM standard medium exhibited externalised flagella (Fig. 3A), whereas parasites cultivated in TYM-DIP inducer medium exhibited all internalised flagella (Fig. 3B).

**Effect of iron depletion on the morphology of *T. vaginalis*** - The examination of the morphology of the *T. vaginalis* population cultivated in TYM standard medium or

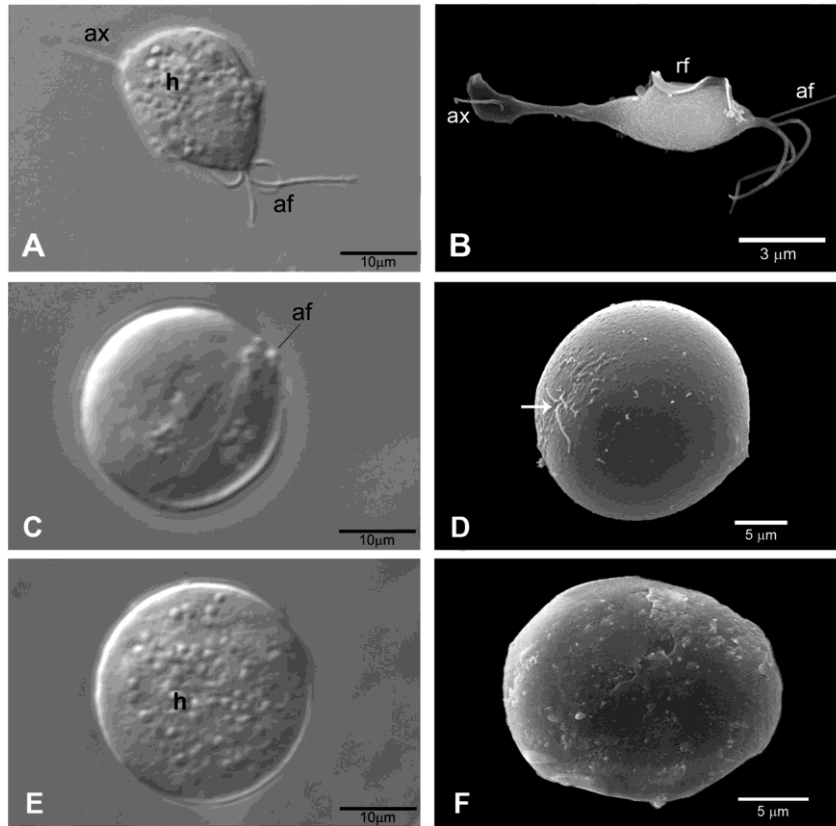


Fig. 2: effect of iron depletion on the morphology of *Trichomonas vaginalis*. Differential interference contrast microscopy (DIC) micrographs (A, C, E) and scanning electron microscopy (B, D, F) of *T. vaginalis*. Parasites cultivated in standard TYM medium for 48 h (A-B) show typical pear-shaped trophozoites with all flagella visible. Parasites cultivated in TYM-DIP inducer medium for 48 h (C-F) exhibited spherical forms at different stages of flagella internalisation (C, D), and typical pseudocysts with all flagella internalised (E, F). The arrow in D indicates the localisation of flagellar internalisation. ax: axostyle; af: anterior flagella; n: nucleus; h: hydrogenosomes.

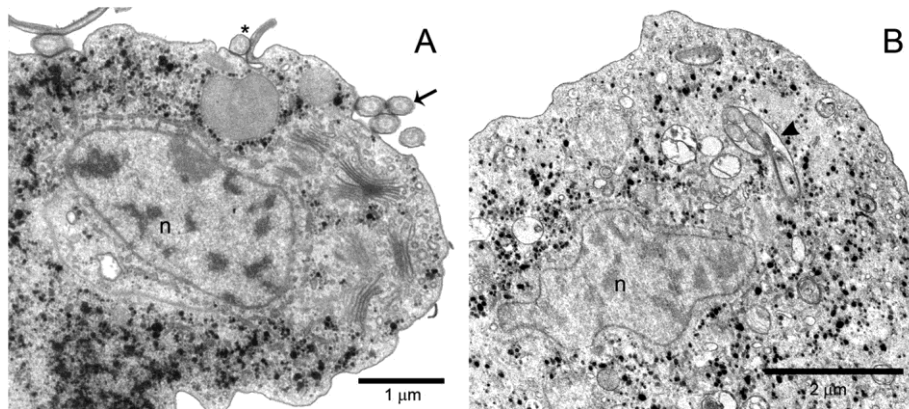


Fig. 3: transmission electron microscopy (TEM) of longitudinal thin sections of *Trichomonas vaginalis*. Parasites cultivated in either standard TYM medium for 48 h (A) or in TYM-DIP inducer medium for 48 h (B). (A) Typical trophozoite exhibiting externalised recurrent flagellum (\*) and four anterior flagella structures (arrow). (B) Pseudocysts phenotype exhibit internalised flagella (arrow head). n: nucleus.

TYM-DIP inducer medium showed that iron depletion induced an increased percentage of pseudocysts over time compared with parasites cultivated in iron-rich medium (Fig. 4). In the control medium, approximately 95% of parasites presented the typical pear-shape motile trophozoite

form during the experimental course (Fig. 4A). Remarkably, under this control condition, the parasite population contained nearly 5% pseudocysts (Fig. 4A). In contrast, in the TYM-DIP inducer medium, an increasing percentage of pseudocysts was observed over time (Fig. 4B). As early

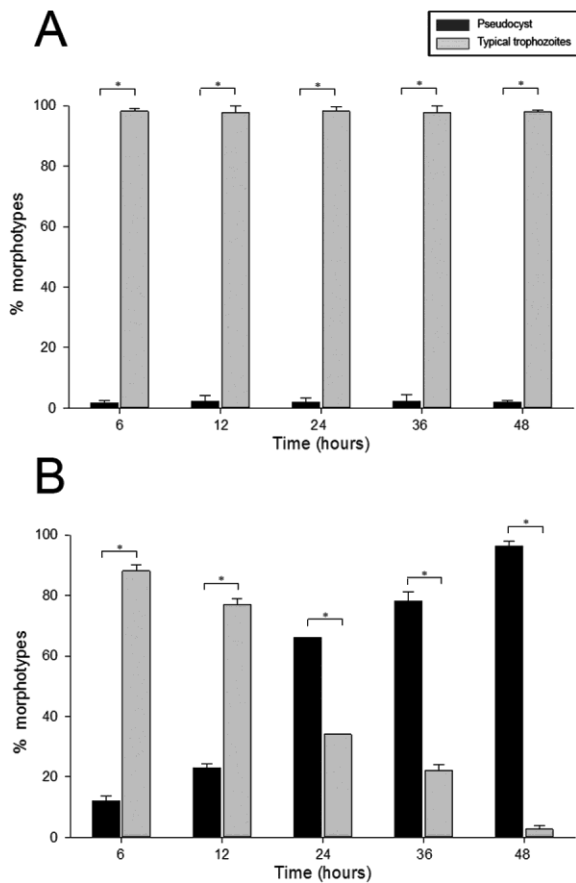


Fig. 4: effect of iron depletion on parasite phenotypes. Parasites were cultivated for 48 h in standard TYM medium (A) or TYM-DIP inducer medium (B). Counting of the parasite phenotypes was performed in triplicate using a haemocytometer. The results are presented as the means and standard errors from three independent experiments. \*Significant differences between morphotypes ( $p < 0.001$ ).

as 6 h of culture, it was possible to observe ~10% pseudocysts, and this number increased steadily over time, reaching 97% pseudocyst forms at 48 h (Fig. 4B).

**Effect of iron depletion on the division process of *T. vaginalis*** - The parasite population cultivated in standard TYM medium for 48 h exhibited cells in different phases of mitosis (Fig. 5A-D). In contrast, the cultivation of parasites in TYM-DIP inducer medium revealed parasites at different stages of flagella internalisation, showing a single nucleus or two nuclei and duplicated anterior flagella, indicating an interruption of the cell division process in different stages of the cell cycle (Fig. 5E, F).

**Phenotype reversibility assay and the effect of  $FeSO_4$  on the morphology of iron depletion-induced pseudocysts**

- To analyse whether iron depletion-induced pseudocysts are viable cellular forms and whether such a phenotype is reversible to a typical trophozoite one, parasites cultivated for 48 h in TYM-DIP inducer medium were reinoculated into standard TYM medium and incubated for additional 24 h. In this assay, a population of *T. vaginalis* cultivated for 48 h in TYM-DIP inducer medium and exhibiting ap-

proximately 97% pseudocysts (Fig. 6A, B) was inoculated into standard TYM medium; after 24 h of incubation, the morphotypes observed were mostly (~90%) typical trophozoites (Fig. 6A, C). The remaining 10% of the parasite population was composed of pseudocyst and parasite forms in the intermediate transformation process.

To evaluate whether iron supplementation could recover the trophozoite morphology and proliferation capability of iron-depletion-induced *T. vaginalis* pseudocysts, parasites cultivated for 48 h in TYM-DIP inducer medium were supplemented with 1.2 mM  $FeSO_4$  and were cultivated for an additional 24 h. Morphotype evaluation showed that iron supplementation indeed recovered typical trophozoite morphology for ~93% of the parasite population, whereas ~7% maintained the pseudocyst form (Fig. 6D). This percentage of pseudocysts was similar to that of the pseudocyst population observed in the control (parasites cultivated in standard TYM medium).

**Interaction of *T. vaginalis* with HeLa and vaginal epithelial cells (VECs)** - Interaction of trophozoites or iron-depletion induced pseudocysts with HeLa cells was evaluated by SEM. Trophozoites exhibited high plasticity, yielding an amoeboid morphology after adhesion to the epithelial cells (Fig. 7A, B). Remarkably, pseudocysts were also able to adhere to HeLa cells, maintaining their spherical forms and emitting discrete membrane projections during contact with the host cell membrane (Fig. 7C, D, arrow).

Similar to that observed in the interaction with HeLa cells, trophozoites readily adhered to VECs, changing their typical ellipsoid forms to adherent amoeboid trophozoites (Fig. 8A, B). Amoeboid parasites exhibited multiple cytoplasmic projections, which mediated the parasite-VEC contact. In contrast, pseudocysts conserved their spherical forms during interaction with VECs but were able to adhere to the cells (Fig. 8C, D).

The percentages of adhesion of trophozoites and pseudocysts to HeLa cells were 74% and 16%, respectively (Fig. 9A), whereas for VECs, the percentages of adhesion were 44.9% and 10.2% for trophozoites and pseudocysts, respectively (Fig. 9B).

## DISCUSSION

In this study, we investigated the morphological alterations of *T. vaginalis* induced by iron depletion and verified the role of iron during the interaction of the parasite with epithelial cells. The results obtained here show that iron depletion (i) interrupts the proliferation of *T. vaginalis*;

(ii) induces morphological changes in typical multiplicative trophozoites to spherical non-proliferative, non-motile pseudocysts; and (iii) induces the arrest of cell division at different stages of the cell cycle. Remarkably, we observed that (iv) iron is the fundamental element for the maintenance of typical trophozoite morphology; (v) pseudocysts induced by iron depletion are viable and reversible forms; and finally, we demonstrated that (vi) pseudocysts induced by iron depletion are able to interact with human epithelial cells, maintaining their spherical forms.

Here, we further analysed the effect of iron depletion on the morphological changes of trophozoites using structural and ultrastructural approaches. We observed

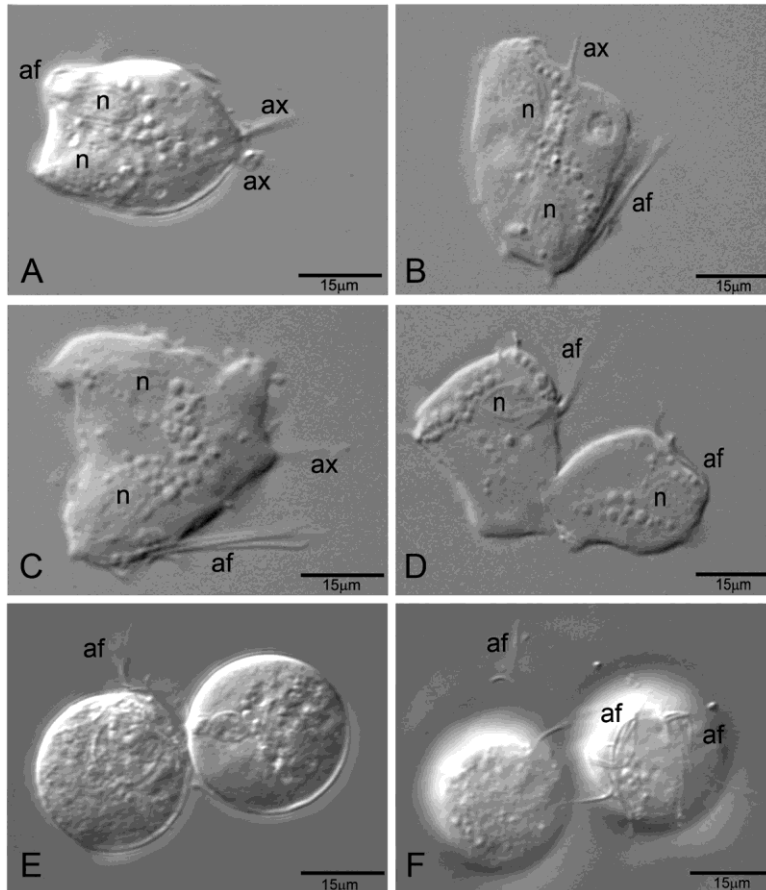


Fig. 5: effect of iron depletion on the division process of *Trichomonas vaginalis*. Differential interference contrast microscopy (DIC) of *T. vaginalis* cultivated in standard TYM medium for 48 h (A-D) showed that trophozoites underwent the cell division process; parasites cultivated in TYM-DIP inducer medium for 48 h (E, F) showed parasites with arrested cell division. ax: axostyle; af: anterior flagella; n: nucleus.

that the inoculation of the trophozoite population from an iron-rich standard medium into an iron-depleted medium immediately interrupts parasite proliferation and induces concomitant morphological transformation to pseudocysts, which are parasite forms without apparent motility. Such a result shows that pseudocysts are non-replicative forms. Accordingly, the previous results of our group showed that iron depletion from *T. vaginalis* culture medium leads to a significant reduction in the expression of crucial proteins involved in the regulation of the cell cycle, protein synthesis, proteolysis and hydrogenosomal metabolism (de Jesus et al. 2007). Drastic alterations in protein synthesis, low metabolic activity and pseudocysts being non-motile parasites support the idea that pseudocysts are the non-replicative form of *T. vaginalis* under iron-depletion conditions. Although several studies have shown the deleterious effect of iron depletion on *T. vaginalis* proliferation and other parasites (Lehker & Alderete 1992, Melo-Braga et al. 2003, de Jesus et al. 2006, 2007, Mesquita-Rodrigues et al. 2013, Hernández-Cuevas et al. 2014, Olmo et al. 2014; Thipubon et al. 2015, Castro et al. 2016), the association of iron depletion with morphological alteration from trophozoites to pseudocysts has not been assessed. Thus, we demonstrated that, in addition to its role in the regulation of parasite pro-

liferation, iron also regulates parasite morphology. Because 2,2-dipyridyl is a lipophilic chelator that chelates iron from both the extracellular and intracellular milieu, the interruption of parasite proliferation could be due to (i) the interruption of the transcription of genes whose promoters are dependent on iron and/or (ii) the decreased or disrupted synthesis of essential [Fe-S] proteins that are crucial for the metabolism of parasites (Vanáčová et al. 2001, Hsu et al. 2012, Beltrán et al. 2013).

We observed that pseudocysts exhibit up to two nuclei. We believe that such an observation is not due to pseudocyst division but to the interruption of the cell division of parasites when they were inoculated into the TYM-DIP inducer medium - i.e., when log-phase trophozoites undergoing division in the pre-inoculum standard TYM medium were inoculated in TYM-DIP inducer medium, they suffered arrest of the cell cycle and concomitantly suffered transformation to pseudocysts. We corroborated that pseudocysts are non-proliferative forms by the lack of an increased cellular density during the growth curve assay in TYM-DIP inducer medium. Bi- and multinucleated pseudocysts have also been observed in *T. vaginalis* (Abonyi 1995) and *T. foetus* (Pereira-Neves & Benchi-mol 2009), including in fresh preputial smegma from infected bulls (Pereira-Neves et al. 2011).

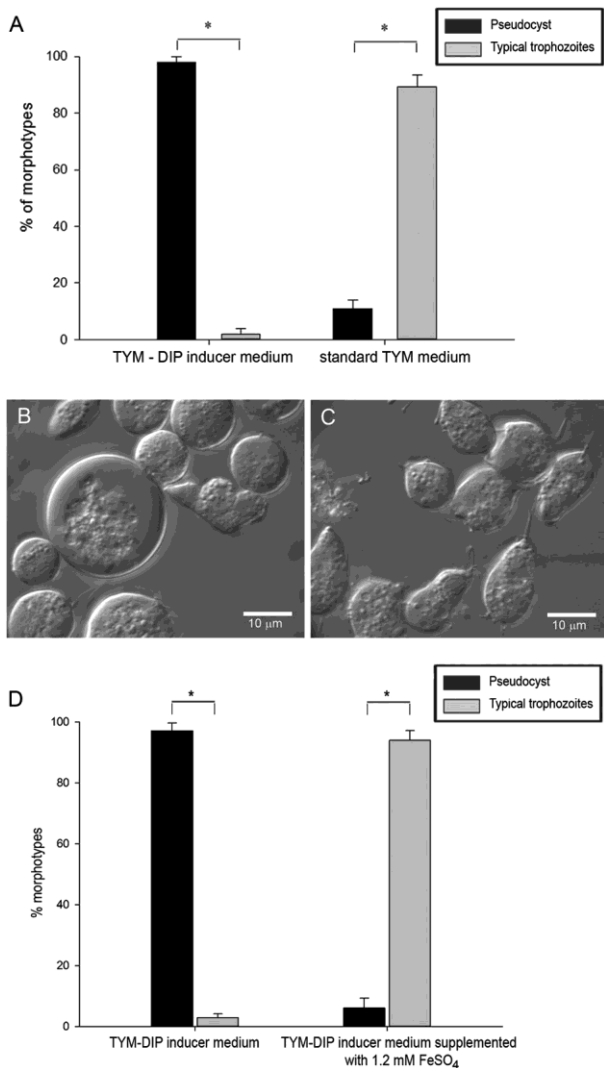


Fig. 6: phenotype reversibility of iron depletion-induced pseudocysts. (A) Parasites maintained for 48 h in TYM-DIP inducer medium (left) were collected, washed in PBS, and subsequently inoculated in fresh standard TYM medium (right) and incubated for 24 h. (B) DIC of *Trichomonas vaginalis* cultivated in TYM-DIP inducer medium for 48 h. (C) DIC of *T. vaginalis* maintained for 48 h in TYM-DIP inducer medium and subsequently inoculated in fresh standard TYM medium and incubated for 24 h. The micrographs show pseudocysts of different sizes (B) or typical pear-shaped trophozoites (C). (D) Effect of FeSO<sub>4</sub> on the morphology of iron depletion-induced pseudocysts. Morphotypes of *T. vaginalis* cultivated in TYM-DIP inducer medium for 48 h (left), or TYM-DIP inducer medium for 48 h and then were supplemented with 1.2 mM FeSO<sub>4</sub> and cultivated for an additional 24 h (right) were estimated by counting in a haemocytometer. The data obtained from three independent experiments are presented as the means  $\pm$  standard error. \*Significant differences between morphotypes ( $p < 0.001$ ).

Trophozoites undergo a transformation from ellipsoid or amoeboid forms to rounded cells in which the flagella are internalised and axostyles are retracted. The formation of pseudocysts occurs in other trichomonads, including *T. tenax* (Ribeiro et al. 2015) and *T. foetus*, when subjected to distinct physical or chemical stimuli in the medium (Granger et al. 2000, Pereira-Neves et al.

2003, da Costa & Benchimol 2004). We previously observed that the alteration of parasite morphology due to iron depletion was followed by a significantly different expression of cytoskeleton-related proteins and proteins involved in cell signalling (de Jesus et al. 2007). The cell surface of trichomonads exhibits an active endocytic machinery (Benchimol et al. 1986, 1990) and it has been suggested that during pseudocyst formation, the flagella are internalised by a receptor-mediated endocytosis process (Granger et al. 2000, Pereira-Neves et al. 2003). In addition, we observed that the sequence of flagellar internalisation was similar to that observed in *T. foetus*, where the recurrent flagellum is internalised first, followed by the anterior flagella (Pereira-Neves et al. 2003). Accordingly, the expression of several proteins involved in membrane remodelling and phagocytosis were modulated by iron depletion in *T. vaginalis* (de Jesus et al. 2007).

We observed that pseudocysts from TYM-DIP inducer medium were able to recover their trophozoite form and resume proliferation after re-inoculation in fresh standard TYM medium. Such results demonstrated that pseudocysts induced by iron depletion are viable and reversible forms. Accordingly, other authors have shown that pseudocysts of trichomonads represent a reversible form of the parasite that may occur as a response to drastic changes in the environment (Lipman et al. 1999, Pereira-Neves & Benchimol 2009). We also observed that iron is the key regulator of trophozoite morphology

because the addition of FeSO<sub>4</sub> to TYM-DIP inducer medium - i.e., chelator-containing medium - reverted pseudocysts to trophozoites and recovered the proliferation capability of the parasite. Additionally, it has been shown that *T. vaginalis* pseudocysts occur naturally in the host, suggesting that these forms may coexist with replicative trophozoites (de Jesus et al. 2004, Afzan & Suresh 2012). The natural occurrence of *T. foetus* pseudocysts was also observed in fresh bull preputial secretion, exhibiting a higher proportion of pseudocysts than that observed in culture *in vitro* (Pereira-Neves et al. 2011).

We also evaluated the capability of the pseudocysts to interact with human epithelial cells. In fact, we observed that although the adhesion percentage of pseudocysts was lower than that for trophozoites, pseudocysts induced by iron depletion were able to interact and adhere to HeLa cells and VECs. Such results, together with the previous observations that pseudocysts are found naturally in the host (de Jesus et al. 2004, Afzan & Suresh 2012), suggest that pseudocysts could persist in the vaginal environment by adhering to host epithelial cells to avoid being carried out by menstrual fluid, for example. Alternatively, during the parasite life cycle, pseudocysts could be released during vaginal discharge, which could favour their dispersion and successful infection. Therefore, knowledge about the biology of pseudocyst formation is important not only to better understand the life cycle of *T. vaginalis* but also to understand their role in the dynamics of parasite transmission. Currently, in many countries, including Brazil, the diagnosis of trichomoniasis is based only on the detection of motile trophozoites in fresh clinical specimens; therefore, false-negative diagnoses may occur during the

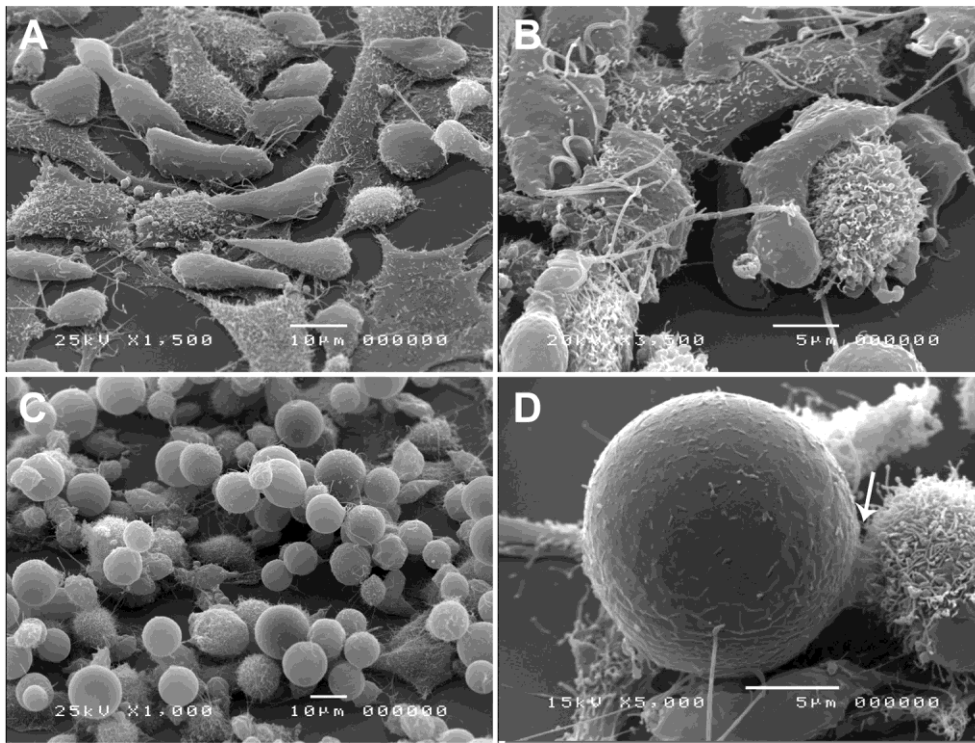


Fig. 7: *Trichomonas vaginalis*-HeLa cell interactions. Representative scanning electron microscopy (SEM) images of the morphology of trophozoites (A-B) or iron-depletion induced pseudocysts (C-D) during interaction with the HeLa cell monolayer. (C) A cluster of pseudocysts was observed. The arrow indicates membrane projections during contact with the host cell membrane.

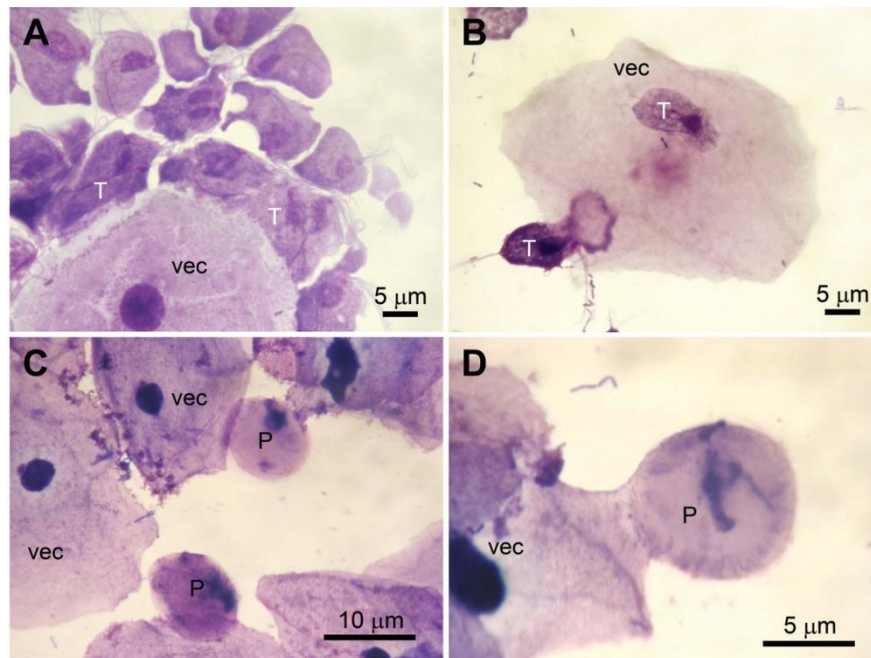


Fig. 8: interaction of *Trichomonas vaginalis* with VECs. Light microscopy of trophozoites-VEC interactions (A, B) or iron-depletion induced pseudocyst-VEC interactions (C, D). Samples were stained with Panotico LB kit®. T: trophozoite; P: pseudocyst.



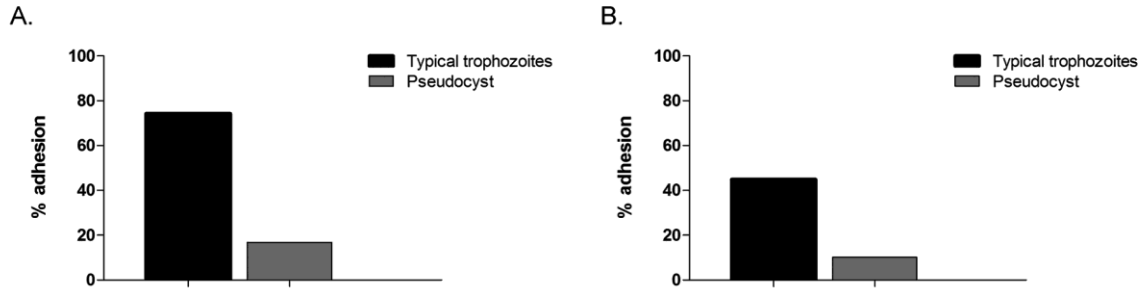


Fig. 9: percentage of adhesion of *Trichomonas vaginalis* trophozoites and iron-depletion induced pseudocysts to epithelial cells. The figure shows the rate of adhesion of trophozoites or iron-depletion induced pseudocysts to HeLa cells (A) or VECs (B).

laboratory analysis of clinical specimens. Searching for pseudocyst forms should also be considered during the diagnosis of trichomoniasis by wet-mount microscopic examination or by culturing methods.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To Plataforma de Microscopia Eletrônica, IOC FIOCRUZ, for technical assistance.

#### AUTHORS' CONTRIBUTION

JB designed the study; GDL, LSV, ETM, NSF, CLFC and JFP performed the experimental work; FOOJ, CB, FCSF, PC and JBJ analysed the data; GDL, PC and JBJ prepared the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

#### REFERENCES

- Abonyi A. Examination of nonflagellate and flagellate round forms of *Trichomonas vaginalis* by transmission electron microscopy. *Appl Parasitol*. 1995; 36(4): 303-10.
- Afzan MY, Suresh K. Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia. *Parasitol Res*. 2012; 111(1): 371-81.
- Alderete JF. Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*. 1999; 67(8): 4298-302.
- Álvarez-Sánchez ME, Solano-González E, Yañez-Gómez C, Arroyo R. Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect*. 2007; 9(14-15): 1597-605.
- Beltrán NC, Horváthová L, Jedelský PL, Sedinová M, Rada P, Maciniková M, et al. Iron-induced changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *PLoS ONE*. 2013; 8(5): e65148.
- Benchimol M, Batista C, de Souza W. Fibronectin- and laminin Mediated endocytic activity in the parasitic protozoa *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *J Submicr Cytol and Pathol*. 1990; 22(1): 39-45.
- Benchimol M, Cunha e Silva NL, Elias CA, de Souza W. *Tritrichomonas foetus*: ultrastructure and cytochemistry of endocytosis. *Exp Parasitol*. 1986; 62(3): 405-15.
- Breuer W, Epsztejn S, Cabantchik ZI. Iron acquired from transferring by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron (II). *J Biol Chem*. 1995; 270(41): 24209-15.
- Cárdenas-Guerra RE, Arroyo R, de Andrade IR, Benchimol M, Ortega-López J. The iron-induced cysteine proteinase TvCP4 plays a key role in *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Microbes Infect*. 2013; 15(13): 959-68.
- Castro C, Menna-Barreto RF, Fernandes NS, Sabóia-Vahia L, Dias-Lopes G, Britto C, et al. Iron-modulated pseudocyst formation in *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology*. 2016; 143(8): 1034-42.
- da Costa RF, Benchimol M. The effect of drugs on cell structure of *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res*. 2004; 92(2): 159-70.
- de Jesus JB, Cuervo P, Junqueira M, Britto C, Silva-Filho FC, Soares MJ. A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics*. 2007; 7(12): 1961-72.
- de Jesus JB, Ferreira MA, Cuervo P, Britto C, Silva-Filho FC, Meyer-Fernandes JR. Iron modulates ecto-phosphohydrolases activities in pathogenic trichomonads. *Parasitol Int*. 2006; 55(4): 285-90.
- de Jesus JB, Vannier-Santos MA, Britto C, Godefroy P, Silva-Filho FC, Pinheiro AA, et al. *Trichomonas vaginalis* virulence against epithelial cells and morphological variability: the comparison between a well-established strain and a fresh isolate. *Parasitol Res*. 2004; 93(5): 369-77.
- Granger BL, Warwood SJ, Benchimol M, de Souza W. Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res*. 2000; 86(9): 699-709.
- Hernández-Cuevas NA, Weber C, Hon CC, Guillen N. Gene expression profiling in *Entamoeba histolytica* identifies key components in iron uptake and metabolism. *PLoS ONE*. 2014; 9(9): e107102.
- Hsu HM, Lee Y, Indra D, Wei SY, Liu HW, Chang LC, et al. Iron-inducible nuclear translocation of a Myb3 transcription factor in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell*. 2012; 11(12): 1441-50.
- Kissinger P. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infect Dis*. 2015; 15: 307.
- Kummer S, Hayes GR, Gilbert RO, Beach DH, Lucas JJ, Singh BN. Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microb Pathog*. 2008; 44(3): 197-203.
- Lehker MW, Alderete JF. Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Mol Microbiol*. 1992; 6(1): 123-32.
- Lipman NS, Lampen N, Nguyen HT. Identification of pseudocysts of *Tritrichomonas muris* in Armenian hamsters and their transmission to mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 1999; 49(3): 313-15.
- Meites E, Gaydos CA, Hobbs MM, Kissinger P, Nyirjesy P, Schwabke JR, et al. A review of evidence-based care of symptomatic Trichomoniasis and asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infections. *Clin Infect Dis*. 2015; 61(8): 837-48.

- Melo-Braga MB, Rocha-Azevedo B, Silva-Filho FC. *Tritrichomonas foetus*: the role played by iron during parasite interaction with epithelial cells. *Exp Parasitol*. 2003; 105(2): 111-20.
- Mesquita-Rodrigues C, Menna-Barreto RFS, Sabóia-Vahia L, da Silva SAG, de Souza EM, Waghbi MC, et al. Cellular growth and mitochondrial ultrastructure of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes are affected by the iron chelator 2,2-dipyridyl. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(10): e2481.
- Meza-Cervantez P, González-Robles A, Cardenas-Guerra RE, Ortega-López J, Saavedra E, Pineda E, 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*. 2011; 157(12): 3469-82.
- Olmo F, Urbanoy K, Rosales MJ, Martín-Escolano R, Sánchez-Moreno MS, Marin C. An in vitro iron superoxide dismutase inhibitor decreases the parasitemia levels of *Trypanosoma cruzi* in BALB/c mouse model during acute phase. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2014; 5(3): 110-16.
- Pereira-Neves A, Benchimol M. *Tritrichomonas foetus*: budding from multinucleated pseudocysts. *Protist*. 2009; 160(4): 536-51.
- Pereira-Neves A, Campero CM, Martínez A, Benchimol M. Identification of *Tritrichomonas foetus* pseudocysts in fresh preputial secretion samples from bulls. *Vet Parasitol*. 2011; 175(1-2): 1-8.
- Pereira-Neves A, Nascimento LF, Benchimol M. Cytotoxic effects exerted by *Tritrichomonas foetus* pseudocysts. *Protist*. 2012; 163(4): 529-43.
- Pereira-Neves A, Ribeiro KC, Benchimol M. Pseudocysts in trichomonads - new insights. *Protist*. 2003; 154(3-4): 313-29.
- Ribeiro LC, Santos C, Benchimol M. Is *Trichomonas tenax* a parasite or a commensal? *Protist*. 2015; 166(2): 196-210.
- Thipubon P, Uthairatana C, Kamchonwongpaisan S, Tipsuwan W, Richairatanakool S. Inhibitory effect of novel iron chelator, *N*-acetyl-6-aminoethyl-3-hydroxy-2-ethylpyridin-4-one (CM1) and green tea extract on growth of *Plasmodium falciparum*. *Malaria J*. 2015; 14: 382.
- Vanáčová S, Rasoloson D, Rázga J, Hrdý I, Kulda J, Tachezy J. Iron-induced changes in pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and involvement of iron in expression of hydrogenosomal proteins. *Microbiology*. 2001; 147(1): 53-62.
- WHO - World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected sexually transmitted infections - 2008. Geneva: WHO; 2012. 20 pp.

## 4 ARTIGO 2

### 4.1 Estado da arte

- Mudanças na expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos foram observadas em *T. vaginalis* cultivados sob diferentes condições de estresse (De Jesus et al. 2007a; Horváthova et al. 2012; Beltrán et al. 2013, Fang et al. 2015);
- Componentes da maquinaria de formação de centros [FeS] são regulados positivamente em condições de restrição de ferro e por diminuição de temperatura (Sutak et al. 2004; Dolezal et al. 2007, Beltran et al. 2013; Fang et al. 2015);
- A atividade do proteasoma é fundamental durante formação de pseudocistos e utilização de inibidores, tais como a gliotoxina, induz a transformação de trofozoítos em pseudocistos irreversíveis (Pereira-Neves et al. 2015; 2016);
- Pseudocistos são capazes de interagir e aderir às diferentes células epiteliais (Mariante et al. 2004; Pereira-Neves et al. 2012; Dias-Lopes et al. 2017);
- Adesinas são proteínas “moonlight” que medeiam a adesão parasito-célula hospedeira e são reguladas por ferro e contato celular (Arroyo et al. 1993; Garcia et al. 2003; Alderete et al. 2004);

### 4.2 Questões propostas no trabalho

O presente artigo visa determinar o proteoma diferencial de trofozoítos e pseudocistos de *T. vaginalis* através da combinação de um eficiente método de preparação de amostra (MED-FASP) com quantificação sem marcação usando o TPA, seguido de validação das diferenças encontradas por ensaios funcionais de bioquímica e citometria de fluxo.

### **4.3 Resultados e contribuições para a área de estudo**

A abordagem utilizada neste trabalho permitiu a compreensão dos mecanismos envolvidos na transformação dos trofozoítos em pseudocistos. Nossos dados forneceram uma análise detalhada das alterações relacionadas ao pseudocisto, incluindo alterações no conteúdo total de proteínas, bem como na composição de diferentes componentes subcelulares, como o citoesqueleto e o proteassoma, e alterações drásticas nos processos biológicos, incluindo tradução, proteólise e metabolismo energético. Os resultados deste manuscrito sugerem que os pseudocistos sofrem importantes alterações estruturais e fisiológicas para sobreviver em condições ambientais adversas.

### **4.4 In-depth quantitative proteomic analysis of trophozoites and pseudocysts of *Trichomonas vaginalis***

## **In-depth quantitative proteomic analysis of trophozoites and pseudocysts of *Trichomonas vaginalis***

Geovane Dias-Lopes<sup>1</sup>; Jacek R. Wiśniewski<sup>2</sup>; Nathalia Pinho de Souza<sup>3</sup>; Vítor Ennes Vidal<sup>4</sup>, Gabriel Padrón<sup>3</sup>, Constança Britto<sup>1</sup>; Patricia Cuervo<sup>3</sup>; José Batista De Jesus<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas – Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>2</sup> Department of Proteomics and Signal Transduction, Max-Planck-Institute for Biochemistry, Martinsried, Germany

<sup>3</sup> Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose – Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>4</sup> Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia - Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>5</sup> Departamento de Medicina – Universidade Federal de São João del Rei, Minas Gerais, Brazil.

### **\*Correspondence to:**

Dr. Jose Batista De Jesus

Departamento de Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de São João del Rei, Campus Dom Bosco, Praça Dom Helvécio, 74, Fabricas. CEP: 36301-160; São João del Rei, MG, Brasil. *Phone:* (5532) 3379-2592. *E-mail:* [jbj@ufsj.edu.br](mailto:jbj@ufsj.edu.br)

## **ABSTRACT**

*Trichomonas vaginalis* is a sexually transmitted anaerobic parasite that infects humans causing trichomoniasis, a common and ubiquitous sexually transmitted disease. The life cycle of this parasite possesses a trophozoite form without a cystic stage. However, the presence of non-proliferative and non-motile, yet viable and reversible spherical forms with internalized flagella, denominated pseudocysts, has been commonly observed for this parasite. To understand the mechanisms involved in the formation of pseudocysts, we performed a mass spectrometry-based high-throughput quantitative proteomics study using a label-free approach and functional assays by biochemical and flow cytometric methods. We observed that the morphological transformation of trophozoite to pseudocysts is coupled to: (i) a metabolic shift toward a less glycolytic phenotype; (ii) alterations in the abundance of hydrogenosomal iron-sulfur cluster (ISC) assembly machinery; (iii) increased abundance of regulatory particles of the ubiquitin–proteasome system; (iv) significant alterations in proteins involved in adhesion and cytoskeleton reorganization; and (v) arrest in G2/M phase associated with alterations in the abundance of regulatory proteins of the cell cycle. These data demonstrate that pseudocysts experience important physiological and structural alterations for survival under unfavorable environmental conditions.

**KEYWORDS:** *Trichomonas vaginalis*; pseudocyst; iron; FASP; Quantitative Proteomics; ‘Proteomic Ruler’; ‘Total Protein Approach’

## INTRODUCTION

*Trichomonas vaginalis* is a sexually transmitted anaerobic parasite of the taxonomic group Excavata that infects humans causing trichomoniasis, a very common sexually transmitted disease. Trichomoniasis is a significant public health problem with an estimated annual incidence of 270 million people worldwide<sup>1</sup>. *Trichomonas vaginalis* infection has been associated with increased susceptibility to human immunodeficiency virus infection and is a high risk factor for cervical and prostate cancer and preterm delivery<sup>2,3</sup>. In addition, increased metronidazole resistance and the lack of alternative treatments<sup>4</sup> have alarmed public health surveillance systems.

The life cycle of *T. vaginalis* possesses a trophozoite form without a cystic stage. However, the presence of spherical forms with internalized flagella, denominated pseudocysts, has been commonly observed for this parasite<sup>5-8</sup>. The occurrence of pseudocysts has been reported for other trichomonads, including *Tritrichomonas muris*<sup>9</sup>, *Tritrichomonas foetus*<sup>5,10,11</sup> and *T. tenax*<sup>12</sup>. Pseudocysts of *T. vaginalis* have also been observed occurring naturally in hosts, suggesting that these forms may coexist with replicative trophozoites<sup>7</sup>. The pseudocysts of *T. foetus* have been observed in fresh bull preputial secretion, reinforcing the natural occurrence of these forms for trichomonads<sup>13</sup>. *In vitro* studies have shown that stress conditions, such as drug pressure, nutrient depletion and low temperature, induce the transformation of trophozoites to pseudocysts<sup>8,10-12,14</sup>. In addition, pseudocyst formation has been observed to be followed by a strikingly significant differential expression of cytoskeleton-related proteins and proteins involved in membrane remodeling and phagocytosis<sup>6</sup>.

Other studies have shown that pseudocysts are non-proliferative and non-motile, but viable and reversible forms that can resume their typical trophozoite form when normal medium conditions are reestablished<sup>5,8,11</sup>. Although pseudocysts are considered lethargic forms of resistance to environmental variation, the pseudocysts of trichomonads are able to interact and adhere to different epithelial cells<sup>8,15,16</sup>. In fact, pseudocysts of *T. foetus* induced by cold or chemical stresses (i) are able to adhere to vaginal epithelial cells (VECs) at a higher rate than trophozoites in a contact-dependent manner; (ii) are more cytotoxic when in contact with MDCK cells (a canine kidney epithelial cell line) and exhibit higher ecto-phosphatase activity than trophozoites; and (iii) exhibit distinct mitosis compared to trophozoites<sup>15-18</sup>. Such findings, together with

the observations that pseudocysts can be isolated from human patients<sup>7</sup>, suggest that pseudocysts could persist in the reproductive tract.

Here, we aimed to study the molecular mechanisms involved in the trophozoite to pseudocyst transformation. We use a well established *in vitro* model for pseudocysts induction by cultivation of *T. vaginalis* in TYM-DIP inducer medium (TYM medium containing iron chelator 2,2-dipyridyl)<sup>6,8</sup>. We performed an in-depth proteomic analysis of trophozoites and pseudocysts of *T. vaginalis* by combining an efficient method for sample preparation, multi-enzymatic digestion–filter aided sample preparation (MED-FASP), with label-free quantitation of protein abundance using the ‘Total Protein Approach’ and the ‘Proteomic Ruler’ methods<sup>19-21</sup>. This approach allowed us to identify and quantify, in terms of absolute concentration and copy number, over eight thousand proteins per cell, thus providing the most comprehensive *T. vaginalis* proteome yet known. Our data allowed a detailed analysis of pseudocyst-related changes including changes in total protein content, in the composition of different subcellular components, such as the cytoskeleton system and proteasome complex, and drastic alterations in biological processes including translation, proteolysis and energy metabolism. These data demonstrate that pseudocysts experience important physiological and structural alterations for survival under unfavorable environmental conditions and/or persistence in the host.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals**

All of the reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), Merck (São Paulo, SP, Brazil) or Bioclin (Belo Horizonte, MG, Brazil). Milli-Q-purified water (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) was used for all solutions. The iron chelator 2,2-dipyridyl is an organic, synthetic, membrane-permeable compound that associates with extracellular and intracellular iron.

### **Microorganisms and culture procedures**

The FMV1 strain of *T. vaginalis*<sup>22</sup> was cultivated at 37 °C in trypticase yeast extract maltose medium (TYM), pH 6.3, supplemented with 10% heat-inactivated bovine serum and 0.6 mM FeSO<sub>4</sub> (standard TYM medium). Pseudocysts were obtained as described previously<sup>8</sup>. In details, parasites cultivated in standard TYM medium were



collected at the logarithmic phase of growth by centrifugation at  $1400 \times g$  for 5 min at 4 °C, washed twice with PBS, pH 7.2, and incubated at 37 °C for 48 h in TYM medium, pH 6.3, supplemented with 10% heat-inactivated bovine serum and 180  $\mu\text{M}$  2,2-dipyridyl (TYM-DIP inducer medium). The parasite densities were estimated by counts in a hemocytometer. For all assays performed, the percentage of pseudocysts or trophozoites was estimated by counting in a hemocytometer. In our control condition (*i.e.*, parasites cultivated in standard TYM medium) the population contained approximately 4-6% pseudocysts and 94-96% trophozoites. Pseudocyst induction was achieved using TYM-DIP inducer medium, and only cultures with >95% pseudocysts were used for all biological replicates. Parasite morphotypes were observed and counted as previously described<sup>8</sup>. Briefly, the percentage of typical flagellated and motile trophozoites or of non-motile spherical pseudocysts without external visible flagella, was determined by differential interference contrast microscopy (DIC) or using slides stained with Panoptic stain. A time course of parasite growth in standard TYM medium was used as a control to determine variation in the number of morphotypes. Three independent assays were carried out in triplicate.

### **Sample preparation for proteomic analysis**

Parasites ( $1 \times 10^6$ ) were lysed in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6, containing 50 mM DTT and 2% SDS (w/v). The protein lysates were boiled at 100 °C for 5 min. After cooling to room temperature, the lysates were clarified by centrifugation at  $16,000 \times g$  for 10 min. The lysates were processed according to the MED-FASP protocol using endoproteinase LysC and trypsin<sup>19,21</sup>. Total protein and peptide were determined using WF assay<sup>23</sup>. Samples were prepared from at least three biological replicates for each trophozoite or pseudocyst morphotype.

### **Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry**

Analysis of peptide mixtures was performed using a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo-Fisher Scientific, Palo Alto). Aliquots containing 2  $\mu\text{g}$  total peptide were chromatographed on a 50 cm column with 75  $\mu\text{m}$  inner diameter packed with 1.8  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> particles (100 Å pore size; Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen, Germany). Peptide separation was carried out using a 105 min acetonitrile gradient in 0.1% formic acid at a flow rate of 250 nl/min. The backpressure varied between 450 and

650 bar. The temperature of the column oven was 55 °C. The mass spectrometer operated in data-dependent mode with survey scans acquired at a resolution of 50 000 at  $m/z$  400 (transient time 256 ms). Up to the top 15 most abundant isotope patterns with charge  $\geq +2$  from the survey scan (300–1650  $m/z$ ) were selected with an isolation window of 1.6  $m/z$  and fragmented by HCD with normalized collision energies of 25. The maximum ion injection times for the survey scan and the MS/MS scans were 20 and 60 ms, respectively. The ion target value for MS1 and MS2 scan modes was set to  $3 \times 10^6$  and  $1 \times 10^5$ , respectively. The dynamic exclusion was 25 s and 10 ppm. Samples from at least three biological replicates for each trophozoite or pseudocyst morphotype were analyzed. The mass spectrometry data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository<sup>24</sup> with the dataset identifier PXD009721.

### **Proteomic Data Analysis**

The spectra were analyzed with MaxQuant Software using the *T. vaginalis* UniProt database (Vers. May 2018). The search was performed with a fragment ion mass tolerance of 0.5 Da and parent ion tolerance of 20 ppm. The maximum false peptide and protein discovery rate was set as 1%. Carbamidomethylation was set as fixed modification and a maximum of two missed cleavages was allowed. Absolute protein quantification was calculated using the ‘Total Protein Approach’ (TPA) method and protein copy number per cells was assessed using the ‘Proteomic Ruler’ approach as previously described<sup>25,26</sup>. The calculations were performed in Microsoft Excel.

### **Determination of glucose consumption**

Consumption of glucose was evaluated using an enzymatic colorimetric kit (K082 Bioclin). Supernatants (100  $\mu\text{L}$ ) of  $1 \times 10^6$  trophozoite or pseudocyst culture media (cultured as above described) were mixed and homogenized with 100  $\mu\text{L}$  enzymatic reagent and incubated at 37 °C for 10 min. Then, samples were read at 505 nm absorbance using sterile culture medium as control. Statistical differences were calculated using *t* student’s test at GraphPad software. Values are presented as the average  $\pm$  standard deviation of three independent biological replicates for each sample.

### **Determination of glycerol production**

For measuring glycerol production by trophozoites or pseudocysts, cells ( $1 \times 10^5$ ) were harvested by centrifugation, washed three times with PBS (pH 7.2) and lysed using a homogenizer-pestle system. Glycerol produced as metabolic product of glycolysis was measured using a Fluorometric Assay Kit (Sigma-Aldrich) following the instructions of the manufacturer. Samples were read at  $\lambda_{\text{ex}} = 535/ \lambda_{\text{em}} = 587$  nm. Statistical differences were calculated using *t* student's test at GraphPad software. Values are presented as the average  $\pm$  standard deviation of three independent biological replicates for each sample.

### **Enzyme activity determination**

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was detected using the LDH UV Kit (Bioclin). Parasites ( $1 \times 10^5$ ) were harvested, washed and lysed as described above. Enzyme activity was determined spectrophotometrically at 340 nm at 37 °C. Absorbances were read every minute during three minutes and the final value was obtained by calculating the delta of the absorbance per minute ( $\Delta A/\text{min}$ ), according to the manufacturer instructions. Statistical differences were calculated using *t* student's test at GraphPad software. Values are presented as the average  $\pm$  standard deviation of three independent biological replicates for each sample.

### **Cell cycle analysis**

For analyzing the cell cycle,  $1 \times 10^6$  trophozoites or pseudocysts were harvested, washed and fixed with 70% ethanol at 4 °C overnight. Further, samples were washed with PBS, resuspended in PBS containing 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase A, incubated for 30 min at 37 °C and stained with 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  propidium iodide (PI) solution for 15 min. Data were acquired using a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) and analyzed using the ModFit 5.0 software. Statistical differences were calculated using *t* student's test at GraphPad software. Values are presented as the average  $\pm$  standard deviation of three independent biological replicates for each sample.

## RESULTS AND DISCUSSION

### General information regarding the proteome of *T. vaginalis*

Structural and ultrastructural changes that occur during the formation of pseudocysts of *T. vaginalis* have been thoroughly described elsewhere. However, the molecular mechanisms that regulate the dynamics of trophozoite transformation into a pseudocyst are unknown. To infer the mechanisms underpinning this process, we assessed the up- and down-regulated sets of proteins during trophozoite to pseudocyst transformation. Samples were processed following the MED-FASP methodology, peptides were analyzed using LC-MS/MS on a Q-exactive mass spectrometer, data were processed using MaxQuant and proteins were quantified by the ‘Total Protein Approach’ and ‘Proteomic Ruler’ methods (Figure 1A).

At a false discovery rate (FDR) of 1%, this approach allowed the identification of 66222 unique peptides, corresponding to 8050 proteins (Tables S1 and S2). A total of 5765 proteins were identified with at least four unique peptides. Our protein dataset represents ~18% of the predicted proteome of *T. vaginalis*<sup>27</sup>. Previous proteomic studies of total extracts from *T. vaginalis* identified up to 238 proteins<sup>6,28-31</sup> whereas studies of subproteomes focusing on membrane, exosomal, hydrogenosomal, secreted or microvesicle-like structure proteins identified 411, 215, 575, 2072 and 592 proteins, respectively<sup>32-38</sup>. Together these studies identified up to 9% of the predicted proteome; thus, our study is the deepest proteome description yet for this protozoan (Figure 1B). Interestingly, even without using any specific fractionation method we were able to identify ~459 hydrogenosomal proteins, which represent ~80% of the hydrogenosomal proteins identified elsewhere after using multiple subcellular fractionation techniques<sup>33-35</sup>. Thus, the MED-FASP method used here for sample preparation proved to be very efficient at analyzing the proteome of *T. vaginalis* without prior cellular fractionation<sup>21</sup>. In terms of copy number per cell, the proteome of *T. vaginalis* spans six orders of magnitude, ranging from 200 to  $2 \times 10^7$  molecules per cell (Figure 1C). Among the most abundant proteins found were glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (23,390,781 copies), actin (22,034,641 copies), enolase (12,524,029), triosephosphate isomerase (8,769,287) and a putative polyubiquitin (7,805,977).

Revision of *T. vaginalis* genome data reduced the original number of predicted protein-coding genes from 60,000 to 46,000<sup>27,39</sup>. According to TrichDB, transcriptional data obtained under different experimental conditions, such as iron or glucose restriction, oxygen stress and interaction with epithelial cells<sup>40-43</sup>, have shown EST evidence for 11,240 protein coding-genes. Remarkably, 63% of the proteins identified here have previous EST evidence, meaning that in that universe of ESTs, 37% of our dataset lacks previous transcriptional

evidence (Table S2). Among this group without transcriptional evidence, we identified, for example, 42 phosphatases and 116 kinases, which are normally expressed in low abundance and are highly regulated. Although the comparison of our proteomic data set with the transcriptional data available may be limited by the different experimental conditions analyzed in the various studies (strains, culture medium, stress conditions), our proteomic data set provides further evidence of gene expression in *T. vaginalis*. In the recent past, a direct correlation between mRNA transcripts and protein levels was assumed. However, significant differences between the abundance of mRNA transcripts and the corresponding protein products are commonly observed both in prokaryotes and eukaryotes, including, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, and mammalian cells<sup>44-46</sup>. Correlation between mRNA and protein levels can be low or even non-existent due to various factors such as different half-lives (of both transcripts and proteins), and posttranscriptional and posttranslational machineries<sup>44-46</sup>.

Regarding functional classification, only ~60% (5155/8050) of the identified proteins possesses at least one annotation among the three main gene ontology categories (biological process, molecular function, or cellular component). In addition, among the identified proteins, 4176 (~52%) are uncharacterized (Table S2). Studying these proteins is fundamental to understanding the biology of the parasite as well as their roles during interactions with host cells. Indeed, when two hypothetical proteins identified in an adherent *T. vaginalis* strain were overexpressed in a non-adherent strain, they increased the capability of transfected parasites to attach to VECs two-fold<sup>32</sup>.

### **Absolute quantitative analysis reveals significant differences between the proteomes of trophozoites and pseudocysts**

Principal component analysis of total protein revealed a clear separation between trophozoite and pseudocyst samples (Figure 2A). Considering a haploid genome<sup>47</sup>, the histone ruler method revealed that trophozoites contain on average 53 pg total protein per cell whereas pseudocysts contain 42 pg (Figure 2B). The lower protein content per cell for pseudocysts agrees with the non-multiplicative status of this form and suggests that protein synthesis is decreased and/or protein degradation is increased in pseudocysts. Accordingly, a significant difference in copy number of ribosome units was observed between trophozoites and pseudocysts; the copy number of ribosomal units summed  $1.19 \times 10^8 \pm 1.14 \times 10^7$  copies per cell in trophozoites in contrast to  $3 \times 10^7 \pm 3.1 \times 10^6$  copies per cell in pseudocysts (Figure 2C). Analysis of the cumulative copy number of proteins organized in specific subcellular

components indicates a clear structural alteration between trophozoites and pseudocysts (Figure 2C). A significant increase in the abundance of nuclear, endomembrane system and endoplasmic reticulum related proteins was observed in pseudocysts, whereas these forms exhibited a significant decrease in cytoskeleton and proteasome complex related proteins (Figure 2C).

A total of 2934 proteins exhibited significant changes in abundance between trophozoites and pseudocysts (Figure 2D and Table S2). Among these, 1349 were down-regulated in pseudocysts whereas 1585 were up-regulated. Among proteins with some functional annotation, analysis by KEGG revealed that down-regulated proteins belong to *ribosome*, *mRNA surveillance pathway*, *glycolysis/gluconeogenesis*, *ribosome biogenesis in eukaryotes*, and *aminoacyl-tRNA biosynthesis* (Figures S1-S5). In agreement with this analysis, the gene ontology enrichment tool of TrichDB revealed that *aminoacyl-tRNA ligase activity* and *ribosome structural composition* were terms ontological enriched among down-regulated proteins, with 7.6- and 2.2-fold enrichment, respectively. In addition, the biological processes of *translation*, *carbohydrate metabolic process* and *tRNA metabolic process* showed enrichments of 2.9, 3.2 and 4.9-fold, respectively (Table S2).

On the other hand, among proteins with some functional annotation, analysis by KEGG revealed that up-regulated proteins belong mainly to *endocytosis*, *proteasome*, *glycolysis/gluconeogenesis*, *nucleotide excision repair*, and *ubiquitin mediated proteolysis* (Figure S5-S9). In addition, the biological processes of *proteolysis* (2.7-fold) and *carbohydrate metabolic process* (2.7-fold), *intracellular signal transduction* (2.8-fold), *cytoplasmic transport* (3.8-fold), *protein folding* (4.9-fold), *response to stimulus* (2.2-fold), *cell adhesion* (3.1-fold) and *iron-sulfur cluster assembly* (13.4-fold) were also enriched (Table S2).

### **Pseudocysts exhibited metabolic adjustment toward a less glycolytic phenotype**

Carbohydrates are the main energy source of *T. vaginalis* via fermentative metabolism. The abundance of enzymes involved in carbohydrate metabolism was significantly altered in pseudocysts (Figure 3 and Table S3). Isoforms of PPI-dependent phosphofructokinase, malate dehydrogenase, phosphoglycerate mutase and alcohol dehydrogenase were up- or down-regulated. Meanwhile, pyruvate kinase, glucokinase, aldolase and lactate dehydrogenase were up-regulated and glucose-6-phosphate isomerase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, glycerol-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase, enolase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and triose-phosphate

isomerase were down-regulated (Figure 3). Based on the cumulative concentration of proteins involved in the cytosolic glycolytic pathway (Figure 4A), it can be suggested that glycolytic metabolism was significantly diminished in pseudocysts. Such a finding is also supported by the observation that glucose consumption was reduced by five-fold in pseudocysts (Figure 4B). In fact, this finding was expected given that pseudocysts are non-motile and non-replicative forms of the parasite<sup>6,8</sup>, in contrast to the vegetative trophozoite stage. Furthermore, the statistically significant difference observed in glycerol production between trophozoites and pseudocysts (Figure 4C), was accompanied by a general reduction in the concentration of enzymes involved in this pathway (Figure 4D). In addition, we observed that many enzymes involved in the pyruvate production pathway were significantly reduced in pseudocysts (Figure 3). On the other hand, two isoforms of lactate dehydrogenase increased dramatically in pseudocysts (Figure 4E). Such alterations were followed by a significant increase in lactate dehydrogenase activity (Figure 4F). Interestingly, increased conversion of pyruvate to lactate was observed in *T. vaginalis* strains selected for metronidazole resistance<sup>48,49</sup>.

Various hydrogenosomal enzymes also exhibited statistical differences in abundance. Concentrations of isoforms of hydrogenosomal enzymes, such as malic enzyme and succinate thiokinase (STK), were all increased in pseudocysts. On the other hand, distinct isoforms of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) and hydrogenase were up- or down-regulated in pseudocysts. In addition, acetate:succinate CoA-transferase (ASCT) and ferredoxin (FDX) were down-regulated (Figure 5). In agreement, it was previously demonstrated by 2DE that the PFO isoform Q27088 was down-regulated in pseudocysts<sup>6</sup>. Altered expressions of enzymes involved in hydrogenosomal carbohydrate metabolism were also observed in *T. vaginalis* cultivated under different stress conditions<sup>6,35,41,50</sup>. Together, increased lactate production and decreased cumulative abundance of enzymes involved in malate production, associated with down-regulation of the main hydrogenosomal enzymes such as PFO and ferredoxin, suggest that pseudocysts experienced a metabolic adjustment toward a less glycolytic phenotype.

### **Hydrogenosomal iron-sulfur cluster (ISC) assembly machinery exhibit substantial up-regulation in pseudocysts**

Energy metabolism in hydrogenosomes of *T. vaginalis* is catalyzed by several iron-sulfur proteins (FeS proteins), such as [2Fe-2S] ferredoxin, [4Fe-4S] pyruvate:ferredoxin

oxidoreductase (PFO), [4Fe-4S] hydrogenase and NADH dehydrogenase subunits (respiratory complex I remnants).

The hydrogenosomal iron-sulfur cluster (ISC) assembly machinery in *T. vaginalis* is similar to that proposed for mitochondriated eukaryotes<sup>51,52</sup>. Proteins involved in this machinery in *T. vaginalis* include IscS, IscU, IscA, Nfu, Isd11, Frataxin, ferredoxin, Ind, HSP 70, Mge, JAC1, HydE, HydG and HydF. In the present study, we identified all of the proteins yet described for this machinery and observed that their abundance was highly increased in pseudocysts (Figure 6 and Table S3). Of the 41 ISC assembly proteins identified, 22 were up-regulated, three were down-regulated and 16 did not exhibit statistically significant alterations. In fact, gene ontology analysis revealed a 13.4-fold enrichment of the biological process of *iron-sulfur cluster assembly*. Up-regulation of components of the hydrogenosomal ISC assembly machinery has been observed by other researchers under iron-restricted and cold-stress culture conditions<sup>35,50,52,53</sup>. Intriguingly, since the abundance of FeS proteins is drastically reduced in parasites cultivated under iron-restricted conditions, it would be expected that proteins of the ISC assembly machinery would also be down-regulated; however, they were found to be up-regulated. It has been suggested that up-regulation of ISC components under conditions of iron-restriction may be due to a common regulatory mechanism for the genes coding for those proteins<sup>35,41</sup>. In *T. vaginalis*, regulation of the iron-dependent expression of hydrogenosomal malic enzyme, as well as some components of the ISC assembly machinery, seems to depend on a complex system involving Myb proteins and Myb regulatory motifs located in 5'-untranslated regions of the genes coding for these proteins<sup>35,41,54,55</sup>. Myb proteins comprise a family of transcription factors that exhibit similar DNA-binding specificities and regulate transcription of specific genes in distinct cell types<sup>55</sup>. Interestingly, we identified three Myb-like DNA-binding domain-containing proteins (A2EE47; A2EWF7; Q58HP3) that were down-regulated in pseudocysts. Accordingly, Myb-like proteins are regulated by medium iron concentration<sup>41,56</sup>. However, further studies are necessary to verify how the Myb proteins here identified act individually or together in the regulation of ISC components.

Together, our findings regarding the regulation of proteins associated with energy metabolism and ISC reveal that proteins such as ferredoxins might be alternatively regulated according to the pathway in which they are participating. Thus, the two ferredoxins (ferredoxin 1 and 2) that were down-regulated probably are not part of the ISC assembly machinery, but instead participate in the energy metabolic pathway that was strongly reduced in pseudocysts.



## **Regulatory particles of the ubiquitin–proteasome system are significantly up-regulated in pseudocysts**

The proteasome is responsible for the control of the cell cycle by degrading regulatory proteins such as transcription factors and cyclins. In addition, the proteasome is related to cell differentiation, stress responses and metabolic adaptation<sup>57</sup>. Remarkably, our proteomics approach allowed all of the proteins of the proteasome complex described to date to be identified. Among these, the regulatory particle of triple-ATPase (Rpt) subunits and the regulatory particle of non-ATPase (Rpn) subunits were significantly increased in pseudocysts (Figure 7 and Table S3). In addition, the ubiquitin mediated proteolysis pathway was also up-regulated in pseudocysts (Figure S9), suggesting that the ubiquitin-proteasome pathway plays an important role in the transformation of trophozoites into pseudocysts. Our results agree with studies of *T. foetus* that showed that proteasome activity increased during pseudocyst formation and that proteasome inhibitors, such as gliotoxin, induce irreversible pseudocyst transformation<sup>58,59</sup>. In addition, the proteasome has been shown to have a role in the encystation process of *Giardia lamblia*<sup>60-62</sup>; the cellular distribution of proteasome subunits was altered during the encystation of this protozoan<sup>61,62</sup>. Additionally, proteasome inhibitors cause a significant decrease in *Giardia* cyst viability, probably due to defects in cell wall maturation<sup>60</sup>. In *Entamoeba* sp., proteasome inhibitors arrest parasite growth and encystation<sup>63</sup>. Thus, although the mechanisms of encystation in those parasites follow different pathways, the role of protein degradation via proteasome pathway seems to be crucial during this process and may also be involved in pseudocyst formation in *T. vaginalis*. In addition, we observed that proteins involved in autophagy, other mechanism for protein degradation involving non-specific engulf cytoplasmic constituents<sup>64</sup>, exhibited significant alteration in abundance in pseudocysts. From 27 proteins here identified as related to autophagy, six were more abundant in pseudocysts whereas two were less abundant when compared to trophozoites (Table S3). Remarkably, autophagy was also observed in *T. vaginalis* submitted to glucose restriction<sup>40</sup>. Thus, our results agree that autophagy is important for parasite survival under nutritional stress<sup>40</sup>.

## **Kinase and phosphatases are differentially regulated in pseudocysts**

The *T. vaginalis* genome exhibits a great expansion in protein kinases, with 880 typical and 40 atypical eukaryotic protein kinases<sup>39</sup>. We identified 345 kinases in our proteomics data set and the abundances of 110 of them were differentially modulated in

pseudocysts. On other hand, we identified 120 protein phosphatases among the 396 predicted for the genome of *T. vaginalis*, of which 53 were modulated in pseudocysts. Intriguingly, whereas serine/threonine-protein phosphatases, including PP1 $\gamma$ , were significantly down-regulated, histidine acid phosphatases were up-regulated (Table S3). Interestingly, PP1 $\gamma$  has been related to *T. vaginalis* proliferation and adhesion<sup>65</sup>.

Regarding kinases, among the tyrosine-kinase like (TKL) family of proteins, we identified one up-regulated and 18 down-regulated in pseudocysts (Table S3). Kinases of the TKL family are important for activating signaling molecules<sup>66</sup>. We also observed significant alterations in the abundances of STE protein kinases, with one STE kinase being up-regulated and four being down-regulated in pseudocysts. Serine/threonine kinases of the STE group are involved in mitogen activated protein (MAP) kinase cascades, which are responsible for cellular response to external signals, such as stress conditions<sup>67</sup>. STE kinases mediate different biological processes including regulation of the mitotic cell cycle, signal transduction and stress-activated protein kinase signaling cascade. Atypical kinases of the phosphoinositide three-kinase-related kinase (PIKK) family were down-regulated in pseudocysts. Among other functions, PIKK kinases regulate DNA damage responses and play critical roles in the control of cell growth<sup>39, 68</sup>. We also identified 13 protein kinases of the AGC family, which are involved in intracellular signal transduction. Within this family, six AGC protein kinases presented decreased abundances in pseudocysts, including the protein kinase A A2F9U6. Iron has been shown to regulate the production of cAMP via protein G, and activate protein kinase A A2F9U6 (corresponding to TVAG\_177140 in reference 69) inducing translocation of the transcription factor Myb3 into the nucleus<sup>69</sup>. Iron overload induces immediate nuclear influx of Myb3 in *T. vaginalis*, indicating that the parasite responds rapidly to changes in the host environment<sup>70</sup>.

Since the pseudocysts analyzed here were induced by iron depletion, our results suggest that this metal is also down-regulating the abundance of the protein kinase A A2F9U6 by four-fold. Although the specific regulatory mechanisms of expression of this enzyme in iron-depletion induced pseudocysts could not be demonstrated here, the alteration in its abundance can alter Myb3 influx, consequently contributing to the drastic alterations in the expression of other proteins identified here.

Although kinases and phosphatases are involved in multiple cellular processes, there is little information about the participation of specific kinases or phosphatases during the life cycle of *T. vaginalis*. Therefore, it was not possible to specifically associate alterations of these enzymes with the transformation process from trophozoite to pseudocyst. However, the

alterations in abundance of kinases and phosphatases observed here would certainly contribute to changes in the cell physiology of such pseudocysts, including their proliferative capability.

### **Pseudocysts exhibit significant alterations of a subset of proteins involved in adhesion and cytoskeleton reorganization**

*Trichomonas vaginalis* exhibits an impressive plastic capability, altering its morphology rapidly after contact with different cell types or inert substrates. Such plastic capability is mainly observed in trophozoites from fresh clinical isolates, while it is reduced in parasites maintained in *in vitro* culture for long periods of time. Morphological transformation from typical ellipsoid trophozoites to flattened, thin, amoeboid organisms is mainly observed in response to environmental variation. Cell-parasite contact-mediated plasticity is associated with cytoskeleton remodeling and with the expression and regulation of different molecules involved in adhesion, including glycoconjugates, laminin, fibronectin and collagen receptors<sup>39,71</sup>.

The genome of *T. vaginalis* encodes 12 actins and diverse actin-related, actin-binding and microfilament-associated proteins that are essential to actin reorganization<sup>72,73</sup>. We identified six actins in our dataset, three of which were down-regulated and one up-regulated in pseudocysts. The cumulative concentration of these actins changed significantly from 95.5 pmol/mg in trophozoites to 40.9 pmol/mg in pseudocysts (Table S3) representing a two-fold reduction in these proteins, thus reinforcing the reduced plasticity of pseudocysts.

In *T. vaginalis*, as well as in other eukaryotes, regulation dynamics of actin microfilaments involves numerous regulatory proteins and actin itself. Proteins regulating polymerization and depolymerization of actin exhibited altered abundance in pseudocysts. The subunit alpha (A2E2L7) and the subunit beta of F-actin capping protein and five profilins increased in abundance whereas another subunit alpha of F-actin capping protein (A2FE30), two actin-related proteins 2/3 complex subunit 3, two fimbrins, and four cofilin/tropomyosin-type actin-binding proteins were down-regulated (Figure 8A). In addition, proteins associated with actin cytoskeleton rearrangements were also modulated in pseudocysts; coronin, actinin and actin family proteins showed decreased abundance while a putative actin-binding protein was increased. Enrichment analysis of all of the proteins with a molecular function annotation for “actin binding” revealed a 6.2-fold down-regulation, while at the same time a three-fold up-regulation. Alpha-actinins, coronins and fimbrins have been associated with actin cytoskeleton rearrangements during parasite amoeboid morphogenesis<sup>71,74,75</sup>. In our study, the

modulation of such proteins may also have been related to the reorganization of the actin cytoskeleton during transformation of trophozoites into pseudocysts. Recently, we observed that *in vitro* induced pseudocysts have reduced plastic capability, and do not transform to amoeboid forms during contact with human epithelial cells. However, it was also observed that pseudocysts preserve their capability to adhere to host cells, but to a lesser degree than trophozoites<sup>8</sup>. In contrast, pseudocysts of *T. foetus* induced by cold or chemical stresses are able to adhere to VECs at a higher rate than trophozoites<sup>15,16</sup>. Nevertheless, it cannot be ruled out that pseudocysts of *T. foetus*, induced by methods other than iron depletion, may respond in a different manner to environmental variation and/or display features different than those observed in *T. vaginalis* by our group<sup>15-18</sup>.

Various proteins with significant alterations in their abundance in pseudocysts were identified among the set of proteins involved in cytoadherence in *T. vaginalis* (Figure 8B and Table S3). Tetraspanins (TSPs) are cell surface proteins involved in adhesion, migration, signal transduction, cell proliferation, and host–parasite interactions<sup>76</sup>. In *T. vaginalis* TSPs have a role in parasite aggregation and are up-regulated upon contact with VECs<sup>32,77</sup>. Transcriptomics of *T. vaginalis* showed that 7 of 8 tetraspanins (TvTSP1, TvTSP3-8) were up-regulated after parasite interaction with VECs. In association with parasite aggregation, higher expression of TvTSP8 was observed in highly adherent strains of *T. vaginalis* than in less adherent strains<sup>77</sup>. The proteomic dataset of the present study shows seven members of the TSP family, of which TSP1, TSP5 and TSP8 increased in abundance in pseudocysts. Proteins containing leucine-rich repeats (LRR), named BspA-like proteins, mediate binding to host epithelial cells, interaction with extracellular matrix (ECM) proteins and cell aggregation on the cell surface of bacteria<sup>78,79</sup>. In *T. vaginalis*, TvBspA proteins are structurally diverse and probably enrich the extracellular pool of proteins of this parasite, suggesting their potential involvement in host-pathogen interactions<sup>80,81</sup>. In addition, evidence of transcription for 30% of *T. vaginalis* BspA genes (270/911) and up-regulation of at least five genes were observed upon contact with ECM proteins<sup>81</sup>. Remarkably, the present data set shows 43 surface antigen BspA-like proteins, of which 18 did lack previous evidence of transcription by either EST or microarray analysis. Of the total of BspA proteins identified here, 23 exhibited increased abundance in pseudocysts, including one (A2DLF6) that was previously observed elsewhere up-regulated in trophozoites upon contact with ECM proteins<sup>81</sup>. Other multifunctional proteins, such as cysteine peptidases, which play roles both in cytoadherence and cytotoxicity to host cells<sup>82,83</sup>, were also positively or negatively regulated in pseudocysts. Among the 41 cysteine peptidases (CPs) identified here, 14 exhibited increased abundance

and three were down-regulated. CPs are located in different parasite compartments, including plasma membranes, and are also found in the supernatant of parasite culture medium and during interaction with host cells<sup>39,80,84</sup>. Different roles in trichomonad virulence have been described for CPs<sup>84,85</sup>. Comparison of *T. vaginalis* strains with high or low virulence showed differential abundance of CPs associated with differential capability of each strain to undergo morphological transformation and interact with host cells<sup>29</sup>.

Six polymorphic membrane proteins (Pmp), proteins associated with cytoadherence in bacteria<sup>86</sup> and containing repetitive motifs that are a signal for endocytosis in *T. vaginalis*<sup>32,85</sup>, were identified in our dataset (Figure 8B). Those proteins have also been identified in the cell surface of this species<sup>32</sup>. Among these, four proteins were more abundant in pseudocysts and one was down-regulated (Table S3). Remarkably, since Pmp and BspA-like have signals for endocytosis<sup>81,85</sup>, it could be suggested that increased abundance of these proteins in pseudocysts is also be related to flagella endocytosis, as observed previously<sup>8</sup>. Moreover, increased abundance of Pmp was observed in strains of *T. vaginalis* highly adherent to VECs when compared to strains exhibiting low levels of adherence, suggesting that Pmp has a role in adhesion and pathogenesis of the parasites<sup>32</sup>. Furthermore, highly adherent parasites also exhibited increased abundance of two uncharacterized proteins, A2DE92 and A2G528 (corresponding to TVAG\_244130 and TVAG\_166850 in reference 32), while overexpression of these proteins in non-adherent parasites increased their adhesion to VECs<sup>32</sup>. Remarkably, these two uncharacterized proteins were found to be more abundant in pseudocysts than in trophozoites.

It was previously observed, through *in vitro* interaction assays, that pseudocysts exhibited low adherence to epithelial cells compared to trophozoites<sup>8</sup>. Here, pseudocysts were observed to exhibit a significant increase in the abundance of a subset of proteins involved in adhesion. These apparently contradictory results could be due to: (i) trophozoites displaying motility whereas pseudocysts are non-motile forms, which makes trophozoites more capable of finding and adhering to epithelial cells than pseudocysts. This could explain the differences in adhesion previously observed between these forms during interaction assays reported previously by our group<sup>8</sup>; (ii) trophozoites of FMV1 strain used here exhibit high plasticity, which is a characteristic found in more adherent strains<sup>87</sup>. Such a plastic phenotype is not observed in iron depletion-induced pseudocysts and may explain the higher adhesion previously observed for trophozoites<sup>8</sup>; (iii) pseudocysts may be increasing the abundance of a subset adhesion molecules in order to compensate for their lack of motility and to preserve a minimum of adhesion to cells of the urogenital epithelium.

## **Arrest of cell cycle progression in pseudocysts is associated with increased CMD1 abundance**

We previously demonstrated that iron-depletion induced pseudocysts are non-proliferative forms<sup>8</sup>. We also observed a significant decrease in the abundance of STE protein kinases, which, among other functions, are involved in the regulation of the mitotic cell cycle. In addition, we observed in pseudocysts a significant 50-fold increase in the abundance of 4-carboxymuconolactone decarboxylase family protein 1 (CMD1) (Figure 9A). It has been shown that CMD1 expression is induced by different stress conditions, such as iron depletion, cold treatment, and glucose restriction<sup>40,41,50</sup>. It has also been recently observed that parasites cultivated under conditions of iron depletion exhibited a substantial increase in CMD1 expression concomitant with a reduction of cells in the G1/S phase and an increase in the number of cells in the G2/M phase<sup>88</sup>. Thus, we assessed the cell cycle of trophozoites and pseudocysts to determine the proportion of cells in each stage. The histograms constructed using the ModFit LT 5.0 software revealed that the pseudocyst population exhibits a significant reduction in the percentage of G1 cells and a significant increase in the percentage of G2/M cells (Figure 9B). In fact, the trophozoite population exhibited an average of 67.3 %  $\pm$  5 % cells in the G1 phase, 23.3 %  $\pm$  5.3 % cells in the S phase, and 9.3 %  $\pm$  1.8 % cells in the G2/M phase (Figure 9C), whereas pseudocysts exhibited an average of 48.8 %  $\pm$  3.6 % cells in the G1 phase, 25 %  $\pm$  0.9 % cells in the S phase, and 26.1 %  $\pm$  3.4 % cells in the G2/M phase (Figure 9C). Thus, our results agree with those previously reported that show a positive correlation between the G2/M phase and CMD1 abundance in *T. vaginalis* cultivated in conditions of iron depletion<sup>88</sup>. Since CMD1 has been located in the basal body of the parasites, and its mRNA and protein abundance are modulated during cell cycle, this protein has been associated with the regulation of cell cycle progression, particularly cytokinesis<sup>88</sup>. Additionally, we observed a negative correlation between the percentage of G2/M cells and the abundance of STE kinases involved in the regulation of the mitotic cell cycle. Together, these proteins might be contributing, as effectors or regulators, to the non-proliferative phenotype of pseudocysts by controlling mitosis and/or modulating cytokinesis.

## **CONCLUSION**

The methodological approach used here enabled the deepest coverage and quantitative analysis of the *T. vaginalis* proteome yet reported. In fact, the wide coverage of the proteome reached here allowed a reliable comparison between trophozoite and pseudocyst proteomes

and the identification of potential mechanisms involved in the transformation process. Functional assays by biochemical and flow cytometric methods support the differences observed by proteomics between the two forms of the parasite. We demonstrated significant changes in protein content, subcellular architecture and metabolic pathways that reflect both structural and physiological dissimilarities between trophozoites and pseudocysts. Together our results demonstrate that pseudocysts present characteristics similar to those observed in resistant forms of protozoan parasites such as: (i) decreased energetic metabolism; (ii) arrest of the cell cycle; (iii) extensive cytoskeleton remodeling; (iv) changes in expression of kinases and phosphatases; and (v) protein turnover, among others.

We also observed that pseudocysts exhibit a significant increase of adhesion-related proteins. In fact, it was previously demonstrated that pseudocysts are able to adhere to host epithelial cells<sup>8</sup>. Interestingly, such adhesion capability is a remarkable difference between pseudocysts and true cysts and could be responsible for parasite persistence in the urogenital tract via adherence to host epithelial cells to avoid being carried out by vaginal discharges.

## REFERENCES

1. World Health Organization (2012) Global incidence and prevalence of selected sexually transmitted infections– 2008. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
2. McClelland, R. S.; Sangare, L.; Hassan, W. M.; Lavreys, L.; Mandaliya, K.; Kiarie, J.; Ndinya-Achola, J.; Jaoko, W.; Baeten, J. M. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *J. Infect. Dis.* **2007**, *195* (5), 698–702.
3. Kissinger, P. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infect. Dis.* **2015**, *15* (1), 307.
4. Meites, E.; Gaydos, C. A.; Hobbs, M. M.; Kissinger, P.; Nyirjesy, P.; Schwebke, J. R.; Secor, W. E.; Sobel, J. D.; Workowski, K. A. A review of evidence-based care of symptomatic Trichomoniasis and asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infections. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *61* (8), 837-848.
5. Pereira-Neves, A.; Ribeiro, K. C.; Benchimol, M. Pseudocysts in trichomonads–new insights. *Protist* **2003**, *154* (3-4), 313-329.
6. De Jesus, J. B.; Cuervo, P.; Junqueira, M.; Britto, C.; Costa e Silva- Filho, F.; Soares, M. J.; Cupolillo, E.; Fernandes, O.; Domont, G. B. A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics* **2007**, *7* (12), 1961-1972.

7. Afzan, M. Y.; Suresh, K. Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia. *Parasitol. Res.* **2012**, *111* (1), 371-381.
8. Dias-Lopes, G.; Saboia-Vahia, L.; Margotti, E. T.; Fernandes, N. S.; Castro, C. L. F.; Junior, F. O. O.; Peixoto, J. F.; Britto, C.; Silva-Filho, F. C.; Cuervo P.; De Jesus, J. B. Morphologic study of the effect of iron on pseudocyst formation in *Trichomonas vaginalis* and its interaction with human epithelial cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2017**, *112* (10), 664-673.
9. Lipman, N. S.; Lampen, N.; Nguyen, H. T. Identification of pseudocysts of *Tritrichomonas muris* in Armenian hamsters and their transmission to mice. *Comp. Med.* **1999**, *49* (3), 313-315.
10. Madeiro da Costa, R. F.; Benchimol, M. The effect of drugs on cell structure of *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol. Res.* **2004**, *92* (2), 159-170.
11. Castro, C.; Menna-Barreto, R. F. S.; Fernandes, N. D. S.; Saboia-Vahia, L.; Dias-Lopes, G.; Britto, C.; Cuervo P.; De Jesus, J. B. Iron-modulated pseudocyst formation in *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology* **2016**, *143*(8), 1034-1042.
12. Ribeiro L. C.; Santos C.; Benchimol M. Is *Trichomonas tenax* a Parasite or a Commensal? *Protist* **2015**, *166* (2), 196–210.
13. Pereira-Neves, A.; Campero, C. M.; Martínez, A.; Benchimol, M. Identification of *Tritrichomonas foetus* pseudocysts in fresh preputial secretion samples from bulls. *Vet. Parasitol.* **2011**, *175* (1-2), 1-8.
14. Granger, B. L.; Warwood, S. J.; Benchimol, M.; Souza, W. Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol. Res.* **2000**, *86* (9), 699-709.
15. Mariante, R. M.; Lopes, L. C., Benchimol, M. *Tritrichomonas foetus* pseudocysts adhere to vaginal epithelial cells in a contact-dependent manner. *Parasitol. Res.* **2004**, *92* (4), 303-312.
16. Pereira-Neves, A.; Nascimento, L. F.; Benchimol, M. Cytotoxic effects exerted by *Tritrichomonas foetus* pseudocysts. *Protist* **2012**, *163* (4), 529-543.
17. Pereira-Neves, A.; Benchimol, M. *Tritrichomonas foetus*: budding from multinucleated pseudocysts. *Protist* **2009**, *160* (4), 536-551.
18. Pereira-Neves, A.; Rosales-Encina, J. L.; Meyer-Fernandes, J. R.; Benchimol, M. *Tritrichomonas foetus*: characterisation of ecto-phosphatase activities in the endoflagellar form and their possible participation on the parasite's transformation and cytotoxicity. *Exp. Parasitol.* **2014**, *142*, 67-82.



19. Wiśniewski, J. R.; Zougman, A.; Nagaraj, N.; Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* **2009**, *6* (5), 359.
20. Wiśniewski, J. R.; Rakus, D. Multi-enzyme digestion FASP and the 'Total Protein Approach'-based absolute quantification of the *Escherichia coli* proteome. *J. Proteomics* **2014**, *109*, 322-331.
21. Wiśniewski, J. R. Quantitative evaluation of filter aided sample preparation (FASP) and multienzyme digestion FASP protocols. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (10), 5438-5443.
22. De Jesus, J. B.; Vannier-Santos, M. A.; Britto, C.; Godefroy, P.; Silva-Filho, F. C.; Pinheiro, A. A. S.; Rocha-Azevedo B.; Lopes A. H. C. S.; Meyer-Fernandes, J. R. *Trichomonas vaginalis* virulence against epithelial cells and morphological variability: the comparison between a well-established strain and a fresh isolate. *Parasitol. Res.* **2004**, *93* (5), 369-377.
23. Wiśniewski, J. R.; Gaugaz, F. Z. Fast and sensitive total protein and peptide assays for proteomic analysis. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (8), 4110-4116.
24. Vizcaino, J. A.; Cote, R. G.; Csordas, A.; Dianes, J. A.; Fabregat, A.; Foster, J. M.; Griss, J.; Alpi, E.; Birim, M.; Contell, J.; O'Kelly, G.; Schoenegger, A.; Ovelheiro, D.; Perez-Riverol, Y.; Reisinger, F.; Rios, D.; Wang, R.; Hermjakob, H. The PRoteomics IDentifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013 *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D1063– 9.
25. Wiśniewski, J. R.; Hein, M. Y.; Cox, J.; Mann, M. A "proteomic ruler" for protein copy number and concentration estimation without spike-in standards. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13* (12), 3497-3506.
26. Wiśniewski, J. R. Label-Free and Standard-Free Absolute Quantitative Proteomics Using the "Total Protein" and "Proteomic Ruler" Approaches. *Methods Enzymol.* **2017**, *585*, 49-60.
27. Smith, A.; Johnson, P. Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Res. Microbiol.* **2011**, *162* (6), 646-654.
28. De Jesus, J. B.; Cuervo, P.; Junqueira, M.; Britto, C.; Silva-Filho, F. C.; Saboia-Vahia, L.; González, L. J.; Domont, G. B. Application of two-dimensional electrophoresis and matrix- assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for proteomic analysis of the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42* (11), 1463-1473.
29. Cuervo, P.; Cupolillo, E.; Britto, C.; González, L. J.; Silva-Filho, F. C.; Lopes, L. C.; Domont G. B.; De Jesus, J. B. Differential soluble protein expression between

- Trichomonas vaginalis* isolates exhibiting low and high virulence phenotypes. *J. Proteomics* **2008**, *71* (1), 109-122.
30. Huang, K. Y.; Chien, K. Y.; Lin, Y. C.; Hsu, W. M.; Fong, I. K.; Huang, P. J.; Yueh Y. M.; Gan R. R. C.; Tang, P. A proteome reference map of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Res.* **2009**, *104* (4), 927.
31. 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. *Infect. Immun.* **2012**, *80* (11), 3900-3911.
32. de Miguel, N.; Lustig, G.; Twu, O.; Chattopadhyay, A.; Wohlschlegel, J. A.; Johnson, P. J. Proteome analysis of the surface of *Trichomonas vaginalis* reveals novel proteins and strain-dependent differential expression. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9* (7), 1554-1566.
33. Rada, P.; Doležal, P.; Jedelský, P. L.; Bursac, D.; Perry, A. J.; Šedinová, M.; Smíšková, K.; Novotný, M.; Beltrán, N. C.; Hrdý, I.; Lithgow, T.; Tachezy, J. The core components of organelle biogenesis and membrane transport in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *PLoS One* **2011**, *6* (9), e24428.
34. Schneider, R. E.; Brown, M. T.; Shiflett, A. M.; Dyall, S. D.; Hayes, R. D.; Xie, Y.; Loo, J. A.; Johnson, P. J. The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *Int. J. Parasitol.* **2011**, *41* (13-14), 1421-1434.
35. Beltrán, N. C.; Horváthová, L.; Jedelský, P. L.; Šedinová, M.; Rada, P.; Marcinčíková, M.; Hrdý I.; Tachezy, J. Iron-induced changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *PLoS One* **2013**, *8* (5), e65148.
36. Twu, O.; de Miguel, N.; Lustig, G.; Stevens, G. C.; Vashisht, A. A.; Wohlschlegel, J. A.; Johnson, P. J. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host:parasite interactions. *PLoS Pathog.* **2013**, *9* (7), e1003482.
37. Nievas, Y. R.; Coceres, V. M.; Midlej, V.; de Souza, W.; Benchimol, M.; Pereira-Neves, A.; Vashisht, A. A.; Wohlschlegel J. A.; Johnson, P. J.; de Miguel, N. Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: characterization and their association with cell interaction. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, 1-16
38. Štáfková, J.; Rada, P.; Meloni, D.; Žárský, V.; Smutná, T.; Zimmann, N.; Harant, K.; Pompach, P.; Hrdý, I.; Tachezy, J. Dynamic secretome of *Trichomonas vaginalis*: Case study of  $\beta$ -amylases. *Mol. Cell. Proteomics* **2018**, *17* (2), 304-320.

39. Carlton, J. M.; Hirt, R. P.; Silva, J. C.; Delcher, A. L.; Schatz, M.; Zhao, Q.; et al. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* **2007**, *315* (5809), 207-212.
40. Huang, K.Y.; Chen, Y. Y. M.; Fang, Y. K.; Cheng, W. H.; Cheng, C. C.; Chen, Y. C.; Wu T. E.; Ku, F. M.; Chen, S. C.; Lin, R.; Tang, P. Adaptive responses to glucose restriction enhance cell survival, antioxidant capability, and autophagy of the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840* (1), 53–64.
41. Horváthová, L.; Šafaříková, L.; Basler, M.; Hrdý, I.; Campo, N. B.; Shin, J. W.; Huang K. Y.; Huang P. J.; Lin R.; Tang, P.; Tachezy, J. Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *Trichomonas vaginalis* genome. *Genome Biol. Evol.* **2012**, *4* (10), 1017-1029.
42. Gould, S. B.; Woehle, C.; Kusdian, G.; Landan, G.; Tachezy, J.; Zimorski, V.; Martin, W. F. Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *Int. J. Parasitol.* **2013**, *43* (9), 707-719.
43. Woehle, C.; Kusdian, G.; Radine, C.; Graur, D.; Landan, G.; Gould, S. B. The parasite *Trichomonas vaginalis* expresses thousands of pseudogenes and long non-coding RNAs independently from functional neighbouring genes. *BMC Genomics* **2014**, *15* (1), 906.
44. Vogel, C.; Marcotte, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13* (4), 227-232.
45. Taniguchi, Y.; Choi, P. J.; Li, G. W.; Chen, H.; Babu, M.; Hearn, J.; et al. Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science* **2010**, *329* (5991), 533-538.
46. Griffin, T. J.; Gygi, S. P.; Ideker, T.; Rist, B.; Eng, J.; Hood, L.; Aebersold, R. Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* **2002**, *1* (4), 323-333.
47. Zubáčová, Z.; Cimburek, Z.; Tachezy J. 2008. Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *161* (1), 49-54.
48. Kulda, J.; Tachezy, J.; Čerkasovova, A. In vitro induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **1993**, *40* (3), 262-269.

49. Rasololon, D.; Vanacova, S.; Tomkova, E.; Razga, J.; Hrdý, I.; Tachezy, J.; Kulda, J. Mechanisms of in vitro development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology* **2002**, *148* (8), 2467-2477.
50. Fang, Y. K.; Huang, K. Y.; Huang, P. J.; Lin, R.; Chao, M.; Tang, P. Gene-expression analysis of cold-stress response in the sexually transmitted protist *Trichomonas vaginalis*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2015**, *48* (6), 662-675.
51. Mühlenhoff, U.; Gerber, J.; Richhardt, N.; Lill, R. Components involved in assembly and dislocation of iron–sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* **2003**, *22* (18), 4815-4825.
52. Sutak, R.; Dolezal, P.; Fiumera, H. L.; Hrdý, I.; Dancis, A.; Delgadillo-Correa, M.; Johnson, P. J.; Müller, M.; Tachezy, J. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101* (28), 10368-10373.
53. Dolezal, P.; Dancis, A.; Lesuisse, E.; Sutak, R.; Hrdý, I.; Embley, T. M.; Tachezy, J. Frataxin, a conserved mitochondrial protein, in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot. Cell* **2007**, *6* (8), 1431-1438.
54. Ong, S. J.; Hsu, H. M.; Liu, H. W.; Chu, C. H.; Tai, J. H. Multifarious transcriptional regulation of adhesion protein gene ap65-1 by a novel Myb1 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot. Cell* **2006**, *5* (2), 391-399.
55. Hsu, H. M.; Ong, S. J.; Lee, M. C.; Tai, J. H. Transcriptional regulation of an iron-inducible gene by differential and alternate promoter entries of multiple Myb proteins in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot. Cell* **2009**, *8* (3), 362-372.
56. Ong, S. J.; Hsu, H. M.; Liu, H. W.; Chu, C. H.; Tai, J. H. Activation of multifarious transcription of an adhesion protein ap65-1 gene by a novel Myb2 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (9), 6716-6725.
57. Paugam, A.; Bulteau, A. L.; Dupouy-Camet, J.; Creuzet, C.; Friguet, B. Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. *Trends Parasitol.* **2003**, *19* (2), 55-59.
58. Pereira-Neves, A.; Gonzaga, L.; Menna-Barreto, R. F.; Benchimol, M. Characterisation of 20S proteasome in *Tritrichomonas foetus* and its role during the cell cycle and transformation into endoflagellar form. *PLoS One* **2015**, *10* (6), e0129165.
59. Pereira-Neves, A.; Menna-Barreto, R. F.; Benchimol, M. The fungal metabolite gliotoxin inhibits proteasome proteolytic activity and induces an irreversible

- pseudocystic transformation and cell death in *Trichomonas foetus*. *Parasitol. Res.* **2016**, *115* (8), 3057-3069.
60. Niño, C. A.; Chaparro, J.; Soffientini, P.; Polo, S.; Wasserman, M. Ubiquitination dynamics in the early- branching eukaryote *Giardia intestinalis*. *Microbiologyopen* **2013**, *2* (3), 525-539.
  61. Stefanic, S.; Palm, D.; Svärd, S. G.; Hehl, A. B. Organelle proteomics reveals cargo maturation mechanisms associated with Golgi-like encystation vesicles in the early-diverged protozoan *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (11), 7595–7604.
  62. Sinha, A.; Datta, S. P.; Ray, A.; Sarkar, S. A reduced VWA domain-containing proteasomal ubiquitin receptor of *Giardia lamblia* localizes to the flagellar pore regions in microtubule-dependent manner. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 120.
  63. Makioka, A.; Kumagai, M.; Ohtomo, H.; Kobayashi, S.; Takeuchi, T. Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Parasitol. Res.* **2002**, *88* (5), 454-459.
  64. Tanaka, K.; Matsuda, N. Proteostasis and neurodegeneration: the roles of proteasomal degradation and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1843* (1), 197-204.
  65. Muñoz, C.; Pérez, M.; Orrego, P. R.; Osorio, L.; Gutiérrez, B.; Sagua, H. et al. A protein phosphatase 1 gamma (PP1 $\gamma$ ) of the human protozoan parasite *Trichomonas vaginalis* is involved in proliferation and cell attachment to the host cell. *Int. J. Parasitol.* **2012**, *42* (8), 715-727.
  66. Carlton, J. M.; Malik, S. B.; Sullivan, S. A.; Sicheritz-Ponten, T.; Tang, P.; Hirt, R. P. The genome of *Trichomonas vaginalis*. In *Anaerobic Parasitic Protozoa: Genomics and Molecular Biology*. Clark, C. G.; Johnson, P. J.; Adam, R. D., Ed.; Norfolk: Caister Academic Press, 2010; pp. 45–80.
  67. Qi, M.; Elion, E. A. MAP kinase pathways. *J. Cell Sci.* **2005**, *118* (16), 3569-3572.
  68. Lovejoy, C. A.; Cortez, D. Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA Repair* **2009**, *8*(9), 1004-1008.
  69. Hsu, H. M.; Lee, Y.; Hsu, P. H.; Liu, H. W.; Chu, C. H.; Chou, Y. W.; Chen, Y. R.; Chen, S. H. Signal transduction triggered by iron to induce the nuclear importation of a myb3 transcription factor in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (42), 29334-29349.
  70. Hsu, H. M.; Lee, Y.; Indra, D.; Wei, S. Y.; Liu, H. W.; Chang, L. C.; Chen, C.; Ong, S. J.; Tai, J. H. Iron-inducible nuclear translocation of a Myb3 transcription factor in

- the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot. Cell* **2012**, *11* (12), 1441-1450.
71. Kusdian, G.; Woehle, C.; Martin, W. F.; Gould, S. B. The actin-based machinery of *Trichomonas vaginalis* mediates flagellate-amoeboid transition and migration across host tissue. *Cell. Microbiol.* **2013**, *15* (10), 1707-1721.
  72. Elmendorf, H. G.; Hayes, R. D.; Srivastava, S.; Johnson, P. J. New insights into the composition and function of the cytoskeleton in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. In *Anaerobic Parasitic Protozoa: Genomics and Molecular Biology*. Clark, C. G.; Johnson, P. J.; Adam, R. D., Ed.; Norfolk: Caister Academic Press, 2010; pp. 119–156.
  73. Preisner, H.; Karin, E. L.; Poschmann, G.; Stühler, K.; Pupko, T.; Gould, S. B. The cytoskeleton of parabasal parasites comprises proteins that share properties common to intermediate filament proteins. *Protist* **2016**, *167* (6), 526-543.
  74. Addis, M. F.; Rappelli, P.; Delogu, G.; Carta, F.; Cappuccinelli, P.; Fiori, P. L. Cloning and molecular characterization of a cDNA clone coding for *Trichomonas vaginalis* alpha-actinin and intracellular localization of the protein. *Infect. Immun.* **1998**, *66* (10), 4924-4931.
  75. Bricheux, G.; Coffe, G.; Bayle, D.; Brugerolle, G. Characterization, cloning and immunolocalization of a coronin homologue in *Trichomonas vaginalis*. *Eur. J. Cell Biol.* **2000**, *79* (6), 413-422.
  76. Hemler, M. E. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev Biol* **2003**, *19* (1), 397-422.
  77. Coceres, V. M.; Alonso, A. M.; Nievas, Y. R.; Midlej, V.; Frontera, L.; Benchimol, M.; et al. The C- terminal tail of tetraspanin proteins regulates their intracellular distribution in the parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell. Microbiol.* **2015**, *17* (8), 1217-1229.
  78. Ikegami, A.; Honma, K.; Sharma, A.; Kuramitsu, H. K. Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. *Infect. Immun.* **2004**, *72* (8), 4619-4627.
  79. Sharma, A.; Sojar, H. T.; Glurich, I.; Honma, K.; Kuramitsu, H. K.; Genco, R. J. Cloning, expression, and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037. *Infect. Immun.* **1998**, *66* (12), 5703-5710.

80. Hirt, R. P.; Noel, C. J.; Sicheritz-Pontén, T.; Tachezy, J.; Fiori, P. L. *Trichomonas vaginalis* surface proteins: a view from the genome. *Trends Parasitol.* **2007**, *23* (11), 540-547.
81. Noël, C. J.; Diaz, N.; Sicheritz-Ponten, T.; Safarikova, L.; Tachezy, J.; Tang, P.; et al. *Trichomonas vaginalis* vast BspA-like gene family: evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. *BMC Genomics* **2010**, *11* (1), 99.
82. Hernández, H.; Sariago, I.; Garber, G.; Delgado, R.; López, O.; Sarracent, J. Monoclonal antibodies against a 62 kDa proteinase of *Trichomonas vaginalis* decrease parasite cytoadherence to epithelial cells and confer protection in mice. *Parasite Immunol.* **2004**, *26* (3), 119-125.
83. Mendoza-López, M. R.; Becerril-Garcia, C.; Fattel-Facenda, L. V.; Avila-Gonzalez, L.; Ruíz-Tachiquín, M. E.; Ortega-Lopez, J.; Arroyo, R. CP30, a Cysteine Proteinase Involved in *Trichomonas vaginalis* Cytoadherence. *Infect. Immun.* **2000**, *68* (9), 4907-4912.
84. Hernández, H. M.; Marcet, R.; Sarracent, J. Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasite* **2014**, *21*, 54.
85. Hirt, R. P.; de Miguel, N.; Nakjang, S.; Dessi, D.; Liu, Y. C.; Diaz, N., Rappelli, P.; Acosta-Serrano, A.; Fiori, P. L.; Mottram J. C. *Trichomonas vaginalis* pathobiology new insights from the genome sequence. *Adv. Parasitol.* **2011**, *77*, 87–140.
86. Mölleken, K.; Schmidt, E.; Hegemann, J. H. Members of the Pmp protein family of *Chlamydia pneumoniae* mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs. *Mol. Microbiol.* **2010**, *78* (4), 1004-1017.
87. Alderete, J. F.; Lehker, M. W.; Arroyo, R. The mechanisms and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Today* **1995**, *11* (2), 70-74.
88. Cheng, W. H.; Huang, K. Y.; Huang, P. J.; Lee, C. C.; Yeh, Y. M.; Ku, F. M.; Lin R.; Cheng, M. L.; Chiu C. H.; Tang, P.  $\gamma$ -Carboxymuconolactone decarboxylase: a novel cell cycle-related basal body protein in the early branching eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Parasit. Vectors* **2017**, *10* (1), 443.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Multi-user Research Facility of Multiparametric Analysis, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. Authors are grateful

to Prof. Matthias Mann for continuous support. We thank Katharina Zettl for technical support.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no competing financial interest.

## FUNDING

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Rio de Janeiro - FAPERJ (P.C. JCNE E-26/201.545/2014 and JCNE E-26/203.253/2017). P.C. is a CNPq PQ-fellow (PQ Process No. 306393/2014-0 and 305796/2017-8). J.B.J is a CNPq PQ-fellow (PQ Process No. 305589/2015-16). G.P. is a CAPES fellow of the Visitant Professor Program (Process No. 0344141). The proteomic analysis was funded by Max-Planck Society for the Advancement of Science by the German Research Foundation (DFG/Gottfried Wilhelm Leibniz Prize).

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Proteomic analysis of trophozoites and pseudocysts of *T. vaginalis*.** (A) Cells were lysed in buffer containing 2% SDS and the extracted proteins processed using the Multienzyme Digestion-Filter Aided Sample Preparation (MED-FASP) method. Each sample was successively digested using endoproteinase LysC and trypsin. Peptides obtained were analyzed with a Q-Exactive-Orbitrap instrument. (B) Number of proteins identified compared to other proteomic studies of *T. vaginalis*. (C) Dynamic range of protein copy numbers across all proteins identified in trophozoites (yellow dots) and pseudocysts (blue dots).

**Figure 2. Quantitative proteomics analysis of trophozoites and pseudocysts.** (A) Principal component analysis of proteomic data. (B) Total protein content per cell determined by total protein approach (TPA) and “proteomic ruler”. Values represent the mean of at least three biological replicates  $\pm$  standard deviation. (C) Protein concentration of the cellular component (GO terms) of the significantly changed proteins. Values represent the mean of at least three biological replicates  $\pm$  standard deviation. (D) Volcano plot of significantly changed proteins; up-regulated proteins (blue) and down-regulated proteins (red) in pseudocyst.

**Figure 3. Occurrence and alteration of proteins involved in the cytosolic glycolytic pathway of *T. vaginalis*.** Protein abundance in pseudocysts was up-regulated (blue), down-regulated (red) or not altered (gray) when compared to trophozoites. Protein



codes are described in Table S1. 1,3BPGA: 1,3-bisphosphoglycerate; DHAP: dihydroxyacetone phosphate; FBP: fructose 1,6-bisphosphate; G3P: glycerol-3-phosphate; GAP: glyceraldehyde-3-phosphate; OAA: oxaloacetate; PEP: phosphoenolpyruvate.

**Figure 4. Alteration to energy metabolism in pseudocysts of *T. vaginalis*.** (A) Comparison of the cumulative concentration of proteins involved in the cytosolic glycolytic pathway. (B) Glucose consumption by trophozoites or pseudocysts. (C) Glycerol production by trophozoites or pseudocysts. (D) Comparison of protein concentration of glycerol-3-phosphate dehydrogenase isoforms. (E) Comparison of protein concentration of lactate dehydrogenase isoforms. (F) Lactate dehydrogenase activity of trophozoites or pseudocysts. All results show values that represent the mean of at least three biological replicates  $\pm$  standard deviation. Statistical significance is indicated by asterisks: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 5. Comparison of the concentrations of hydrogenosomal energy metabolism proteins between trophozoites and pseudocysts.** Protein concentrations are expressed as pmol/mg total protein. Proteins marked with an asterisk were significantly regulated. Protein codes are described in Table S1. Fdx: ferredoxin; PFO: pyruvate:ferredoxin oxidoreductase; ASCT: acetate:succinate CoA-transferase; STK: succinate thiokinase; CoA: Coenzyme A. Values represent the mean of at least three biological replicates  $\pm$  standard deviation. Statistical significance is indicated by asterisks: \* $p < 0.05$ .

**Figure 6. Comparison of the concentrations of iron-sulfur cluster assembly machinery proteins between trophozoites and pseudocysts.** Figure shows the proteins that exhibited a significant alteration to their abundance,  $p < 0.05$ . Protein concentrations are expressed as pmol/mg total protein. Values represent the mean of at least three biological replicates  $\pm$  standard deviation.

**Figure 7. Components of *T. vaginalis* proteasome.** (A) Alterations in protein abundance of subunits of the proteasome complex of pseudocysts are showed in blue (up-regulated) or red (down-regulated). Proteins in black were identified but did not experience a change in their abundance. Figure shows a scheme of proteasome adapted from KEGG. (B) Comparison of protein copy number per cell of subunits significantly regulated in trophozoites and pseudocysts,  $p < 0.05$ . Values represent the mean of at least three biological replicates  $\pm$  standard deviation.

**Figure 8. Comparison of the concentrations of proteins involved in cytoskeleton reorganization and adhesion in trophozoites and pseudocysts.** (A) Cumulative concentration of actin and actin-related proteins. (B) Cumulative concentration of adhesion-

related proteins. Protein concentrations are expressed as pmol/mg total protein. Uncharacterized proteins correspond to A2DE92 and A2G528. Values represent the mean of at least three biological replicates  $\pm$  standard deviation. Only statistically significant data are shown,  $p < 0.05$ .

**Figure 9. Cell cycle regulation in trophozoites and pseudocysts.** (A) Comparison of the concentrations of cell cycle-related proteins between trophozoites and pseudocysts. Values represent the mean of at least three biological replicates  $\pm$  standard deviation. Only statistically significant data are shown,  $p < 0.05$ . (B) Representative analysis of cell cycle phases (G1, S, G2/M) of trophozoites and pseudocysts. Data acquisition was performed using a flow cytometer and analysis was performed using ModFit LT 5.0 software. (C) Cell percentage at G1, S or G2/M phases. Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation across three independent biological experiments, \*\*\* $p < 0.001$ .

## SUPPORTING INFORMATION

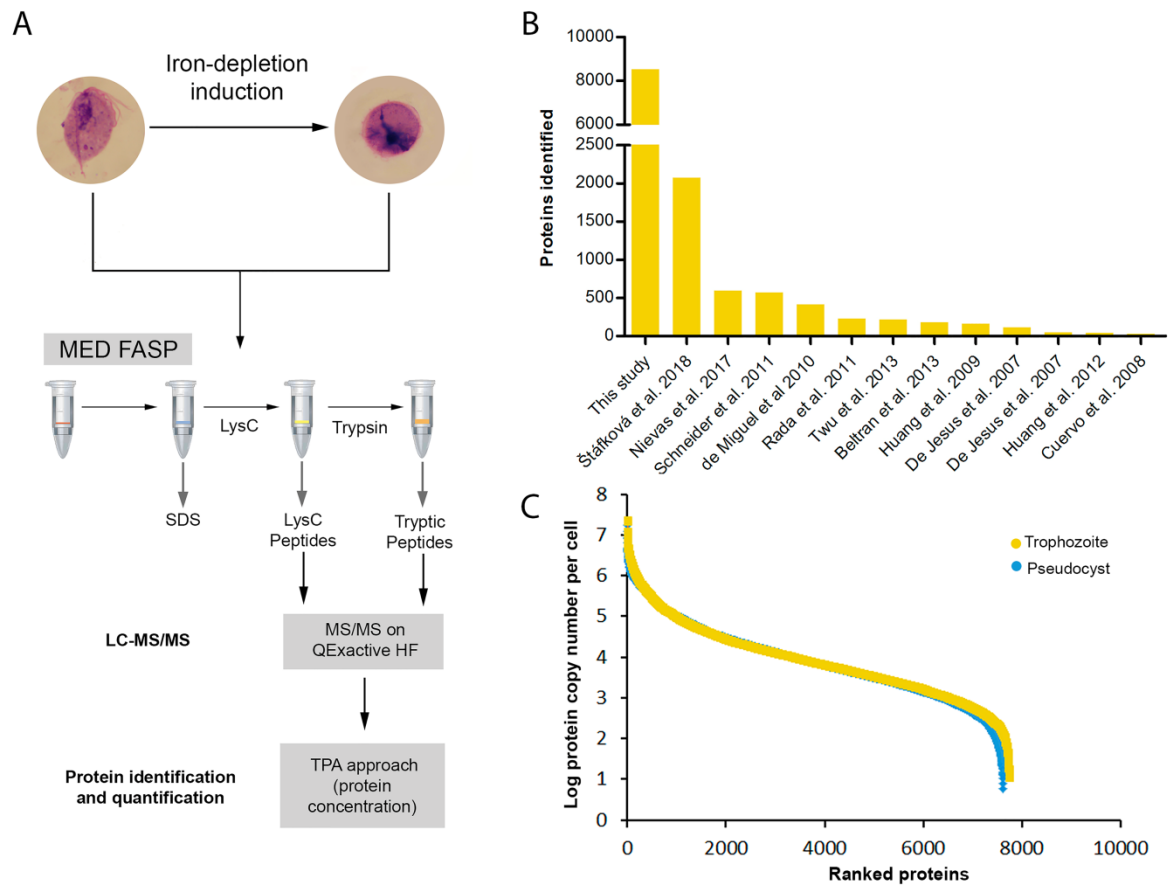
The following supporting information is available free of charge at ACS website <http://pubs.acs.org>

**Supporting Figures S1-S9.** KEGG pathways of significantly changed proteins.

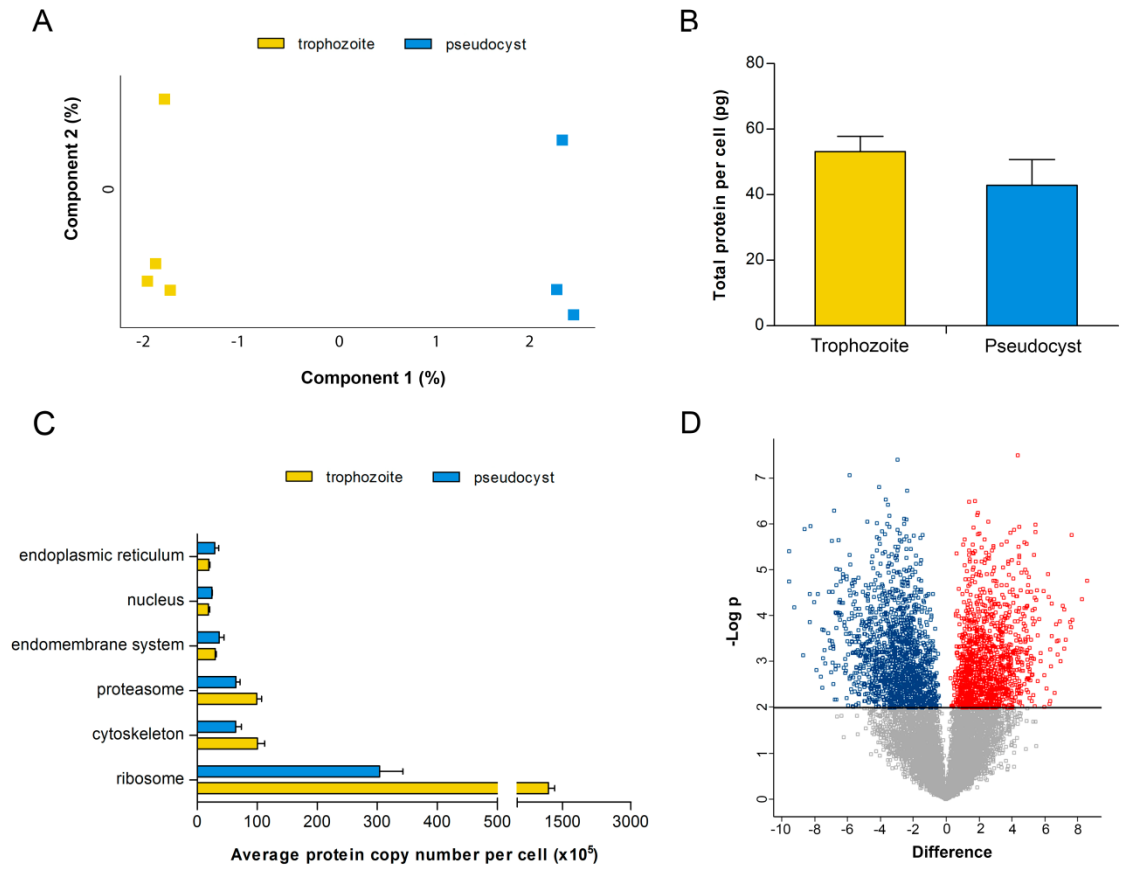
**Supporting Table S1.** Proteins identified in *Trichomonas vaginalis*.

**Supporting Table S2.** Statistical analysis of proteomic data.

**Supporting Table S3.** Proteomics data of specific groups of proteins.



**Figure 1**



**Figure 2**

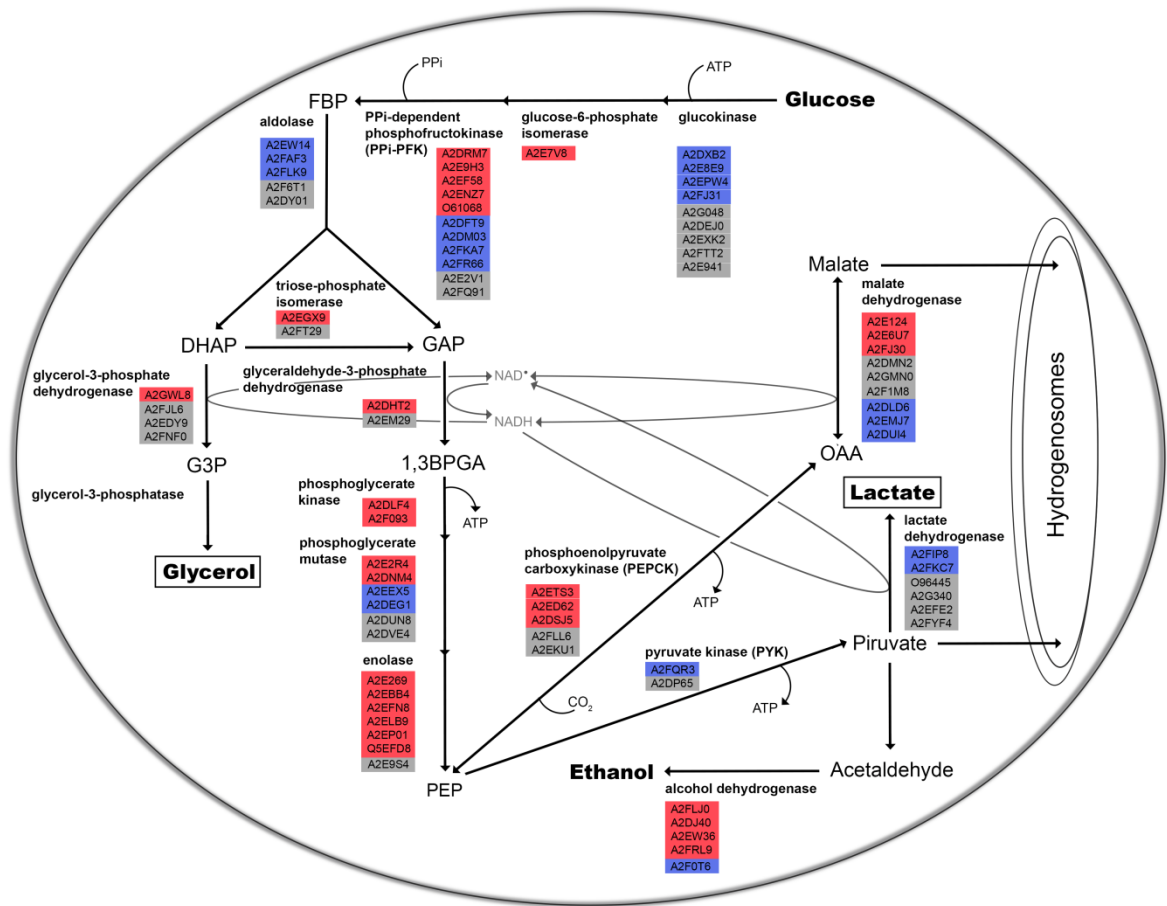
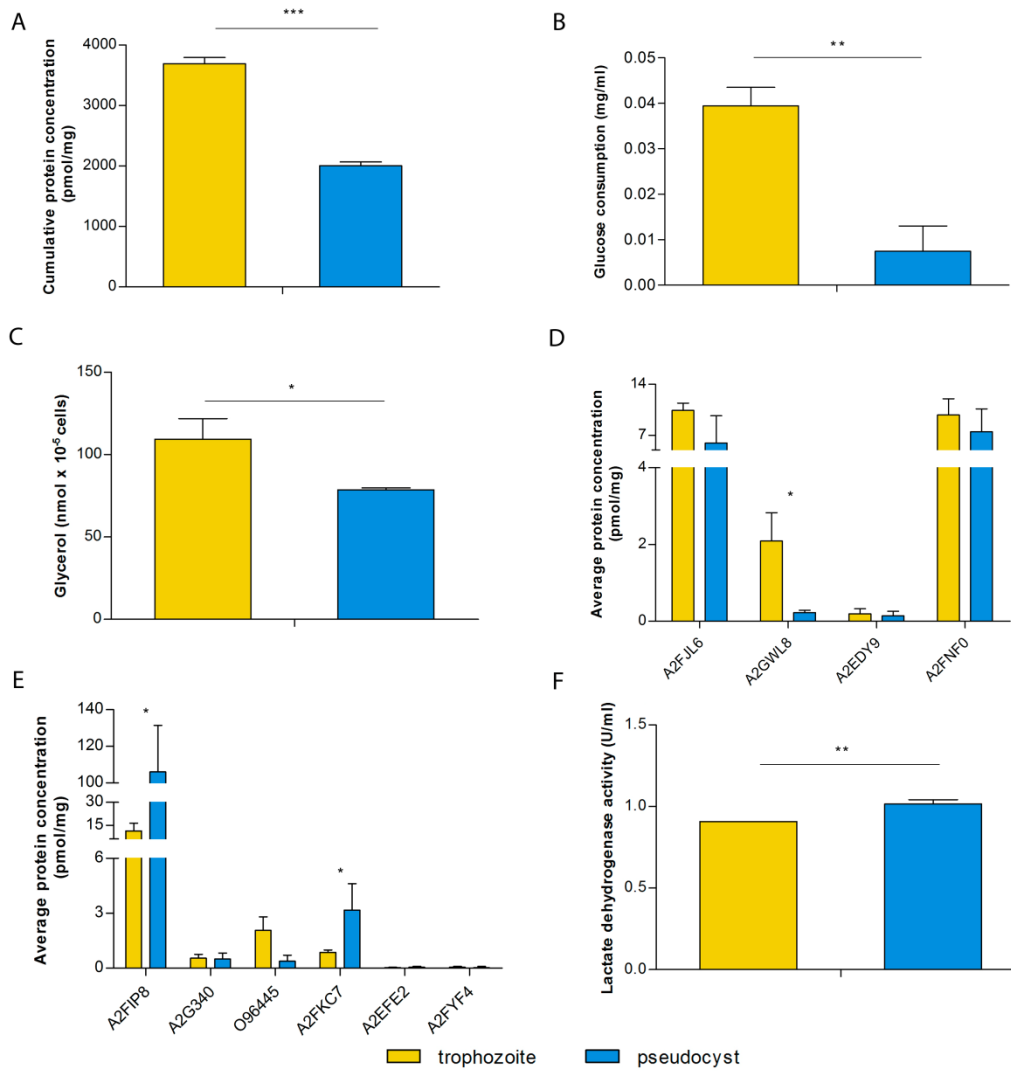
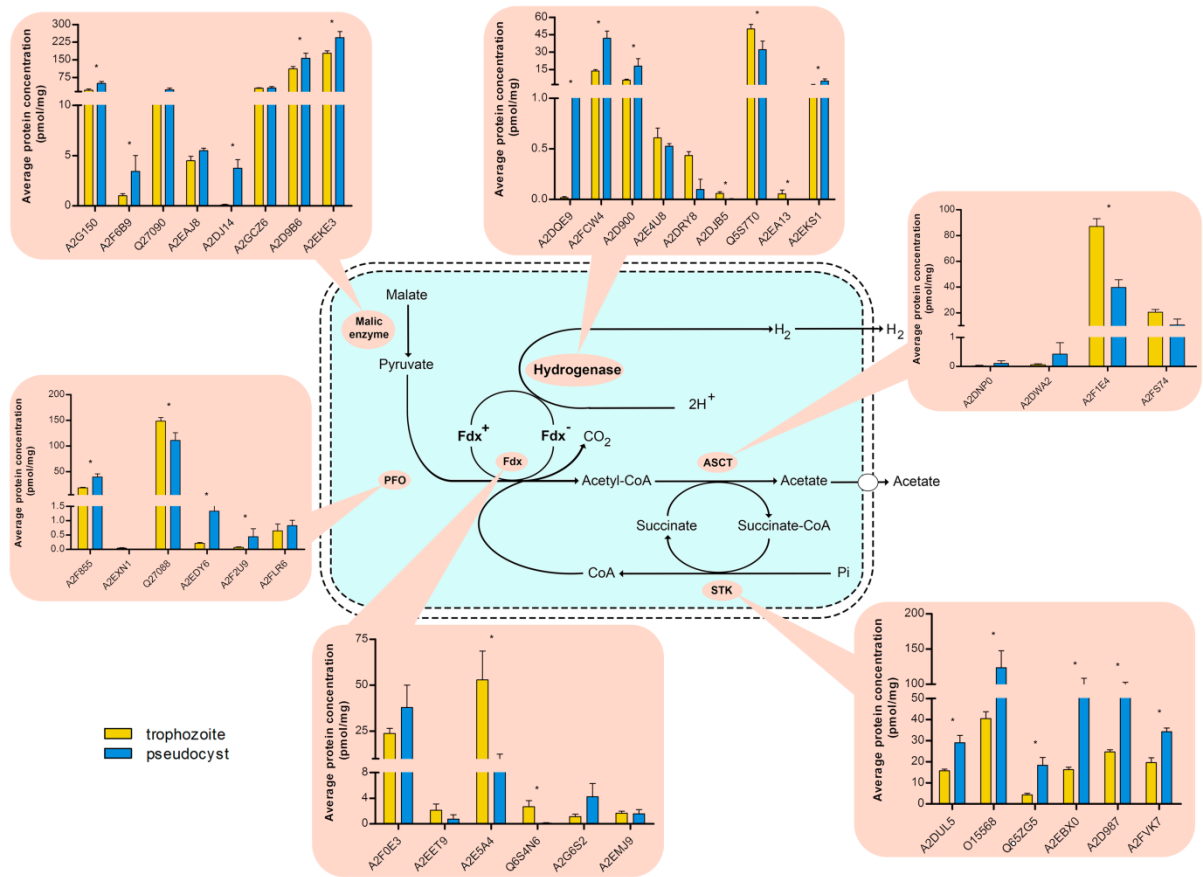


Figure 3



**Figure 4**



**Figure 5**

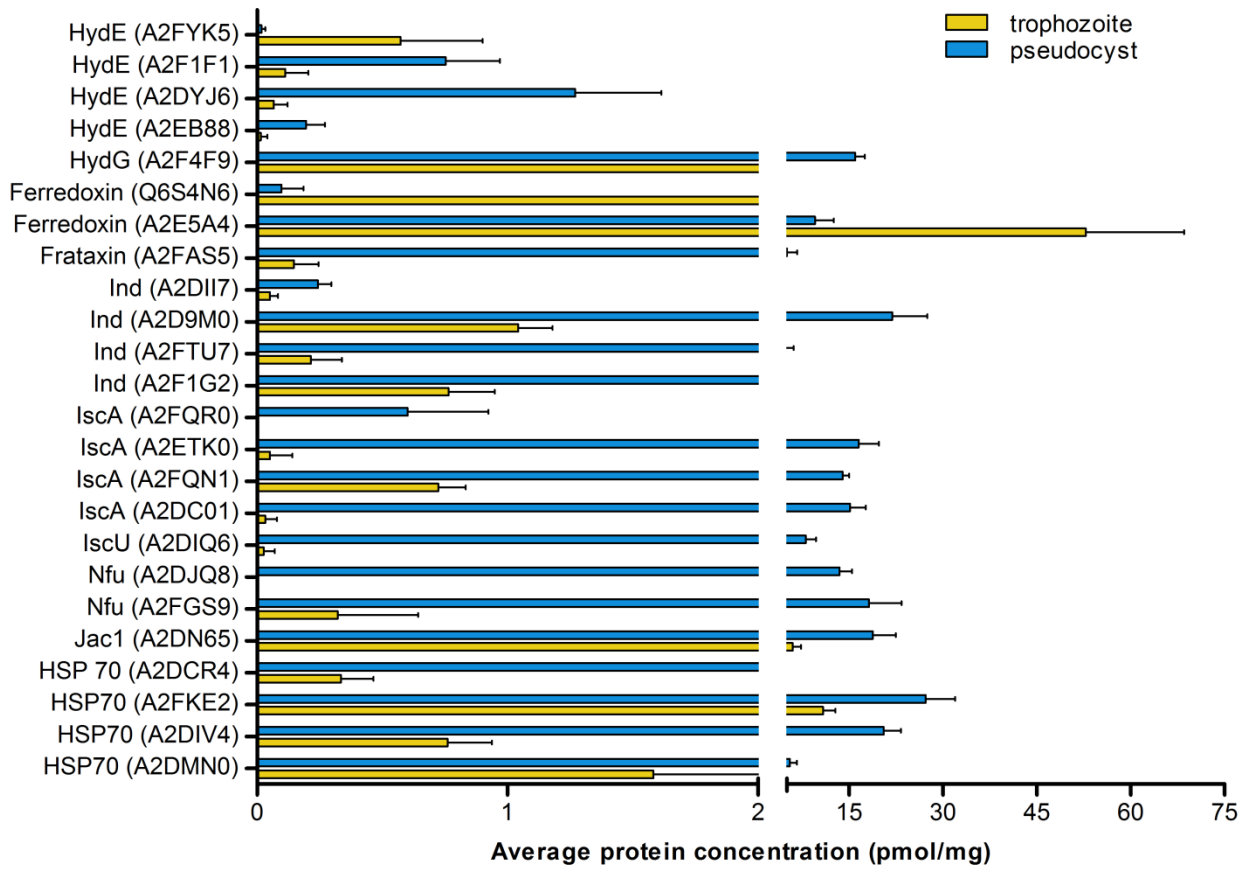


Figure 6

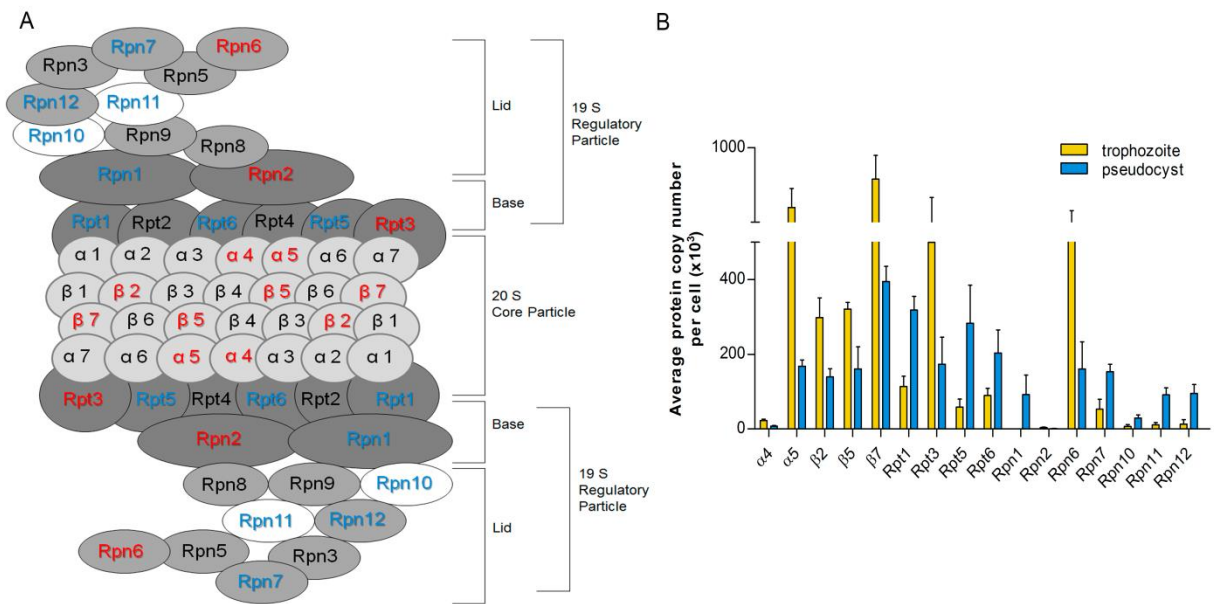
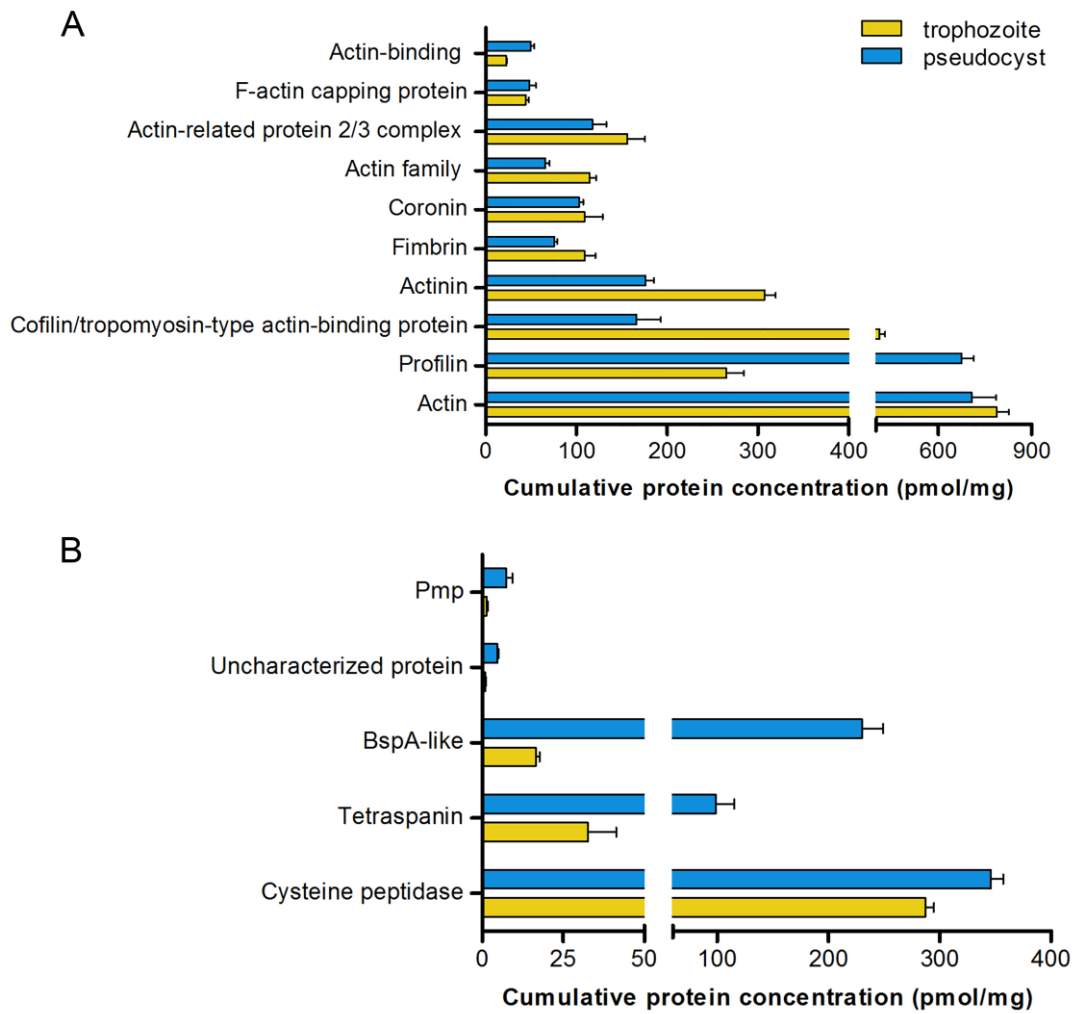
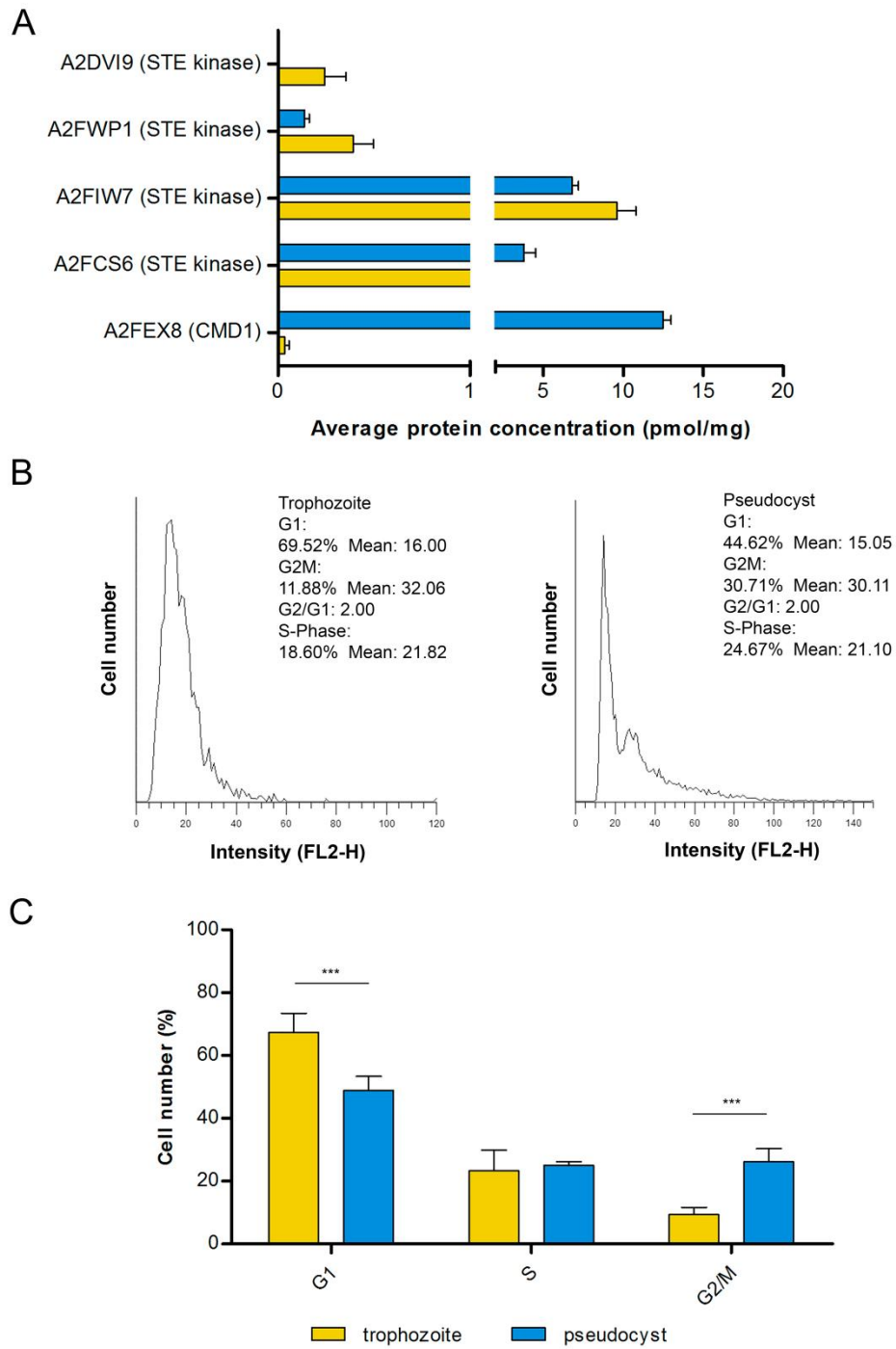


Figure 7

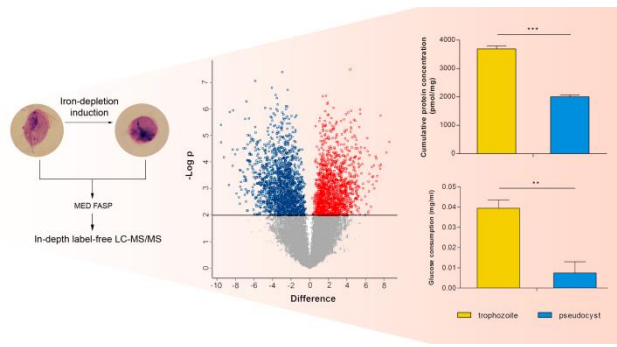




**Figure 8**



**Figure 9**



for TOC only

## 5 DISCUSSÃO

Em tricomonádídeos, o ferro é importante em diversos processos celulares, principalmente no metabolismo hidrogenossomal, bem como na adesão e citotoxicidade à célula hospedeira (Vaňáčová et al. 2001, Hsu et al. 2009, Horváthová et al. 2012, Beltrán et al. 2013). Em uma investigação anterior de nosso grupo, foi demonstrado que a depleção de ferro altera a expressão proteica global e a morfologia celular de *T. vaginalis* (De Jesus et al. 2007a). Nesta tese, o objetivo foi estudar o processo de indução de pseudocistos em *T. vaginalis*, utilizando meio TYM depletado de ferro, e avaliar a capacidade de adesão de pseudocistos às células-alvo, um importante fator na relação parasito-hospedeiro. Os resultados de análise estrutural, ultraestrutural e bioquímica demonstram que a restrição nutricional de ferro induz a transformação de trofozoítos em pseudocistos, os quais se mantêm viáveis, sem motilidade, com reduzida capacidade metabólica e perda da habilidade plástica, embora ainda mantenham capacidade de adesão às células hospedeiras. Os mecanismos moleculares da transformação de trofozoítos em pseudocistos foram explorados por uma análise proteômica aprofundada em que se investigou a composição subcelular e a abundância de proteínas específicas, complexos proteicos e vias metabólicas. A partir de tais resultados, propomos que pseudocistos são células que compartilham tanto características das formas de resistência de outros protozoários assim como de formas infectivas, pois apresentam capacidade de interagir com as células epiteliais. Tais características, presentes em uma mesma forma do ciclo de vida de *T. vaginalis*, poderiam ter conferido ao parasito a habilidade necessária para colonizar o trato urogenital humano.

Análises por microscopia ótica revelaram alterações morfológicas em *T. foetus* cultivados na ausência de ferro (Melo-Braga et al. 2003). Posteriormente, nosso grupo demonstrou a indução de pseudocistos em *T. foetus* utilizando a depleção de ferro (Castro et al. 2016). Este protozoário responde de forma similar quando exposto à drogas que afetam os microtúbulos ou à drásticas variações de temperatura, internalizando o flagelo e tornando-se esférico (Granger et al. 2000; Ribeiro et al. 2002; Pereira-Neves et al. 2003; Pereira-Neves e Benchimol, 2009; Pereira-Neves et al. 2015, 2016), enquanto em *T. vaginalis* ainda não existem trabalhos sobre esta alteração morfológica após exposição à compostos que afetam microtúbulos. Em relação à indução por baixa temperatura, o grupo de Petrus Tang

utilizou o termo pseudocistos em um artigo sobre fosfoproteoma de trofozoítos, pseudocistos e amebóides (Yeh et al. 2013), porém, em trabalho posterior, ele optou por utilizar um novo termo “resposta ao estresse de frio” (do inglês *cold-stress response*) para a mesma condição de indução (4°C) do artigo anterior (Fang et al. 2015). Dessa forma, para estudos *in vitro* com pseudocistos em *T. vaginalis*, a única forma de indução descrita até o momento é a estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando a depleção do ferro (Dias-Lopes et al. 2017).

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento desta tese são aqui apresentados e discutidos em dois trabalhos, sendo um já publicado e outro submetido à publicação. No primeiro artigo, as investigações focaram na análise morfológica e formação dos pseudocistos, na sua capacidade de replicação e interação com células epiteliais. Assim, foi demonstrado que a depleção de ferro induz a transformação de trofozoítos multiplicativos típicos em pseudocistos esféricos, não proliferativos, e sem motilidade. Os resultados mostram que a manutenção da forma de trofozoíto é dependente de ferro e, também, que é a restrição deste metal no meio de cultura, e não o quelante 2,2-dipiridil *per se*, que induz a transformação morfológica dos trofozoítos em pseudocistos, uma vez que os pseudocistos presentes no meio indutor TYM-DIP por 48 horas, quando suplementado apenas com FeSO<sub>4</sub>, (ainda que na presença de mesma concentração do 2,2-dipiridil) retornam à forma típica de trofozoítos após 24 horas de cultura. Em ensaio complementar, observou-se que a inoculação de pseudocistos - provenientes do meio indutor TYM-DIP por 48 horas - em meio controle TYM após 24 horas de cultura induz à recuperação da forma de trofozoíto, mostrando também, com isso, que aquelas são formas viáveis e reversíveis. Parasitos arredondados e sem flagelos aparentes, foram observados na fase logarítmica de culturas de *T. vaginalis* e o estudo apontou que estas células eram formas viáveis, porém ainda desconhecidas da biologia do parasito (Abonyi 1995). Estas células arredondadas também foram descritas em *T. foetus*, e assim como em *T. vaginalis* estão em baixa proporção (~5%) em culturas axênicas (Pereira-Neves et al. 2003). Além disso, pseudocistos de *T. vaginalis* ocorrem naturalmente no hospedeiro, juntamente com trofozoítos replicativos (de Jesus et al. 2004, Afzan e Suresh 2012). Em *T. foetus*, presentes na secreção prepucial de touro, é observada uma maior proporção de pseudocistos, quando compada às culturas *in vitro* (Pereira-Neves et al. 2011). Pseudocistos de *T. muris* e de tricomonadídeos do intestino de aves foram descritos

como formas viáveis e infectivas (Pereira e Almeida 1940; Mattern e Daniel 1980; Friedhoff et al. 1991; Lipman et al. 1999). Tais observações, juntamente com a descrição de pseudocistos em outros tricomonadídeos como *Trichomitus batrachorum*, *Trichomitus sanguisugae* e *Ditrichomonas honigbergii* (Mattern et al. 1973; Brugerolle 1975; Farmer 1993), sugerem a importância do pseudocisto no ciclo de vida deste grupo de protozoários, assim como seu papel como forma de resistência às condições adversas do meio.

Em relação à capacidade de adesão às células epiteliais humanas, foi observado no presente trabalho que os pseudocistos induzidos pela depleção de ferro são capazes de aderirem, mantendo a forma arredondada, porém, emitindo projeções citoplasmáticas em associação com as células epiteliais. Ensaio quantitativos da adesão corroboraram estas observações, demonstrando que pseudocistos aderem tanto às células HeLa quanto às VECs recém obtidas, embora a uma proporção de  $\cong 4$  e 5 vezes menor, respectivamente, em relação aos trofozoítos. É interessante ressaltar que a capacidade de aderir corrobora a hipótese de que pseudocisto não é uma forma degenerativa, mas uma forma viável que é capaz de interagir e aderir firmemente às células hospedeiras. Em *T. foetus* foi demonstrado que os pseudocistos, induzidos por baixa temperatura, possuem a capacidade de aderir e causar efeito citotóxico às células epiteliais (Mariante et al. 2004; Pereira-Neves et al. 2012). Diferentemente do que observamos, a taxa de adesão de pseudocistos de *T. foetus* induzidos por baixa temperatura é maior do que trofozoítos (Mariante et al. 2004), o que pode ser explicado pelo método de indução ou ainda pela espécie de tricomonadídeo. Em um artigo mais recente foi demonstrado que estes pseudocistos de *T. foetus* induzidos por baixa temperatura são mais citotóxicos que os trofozoítos. Além disso, estas formas exibiram uma transformação amebóide mais intensa do que os trofozoítos, durante interação com células MDCK (Pereira-Neves et al. 2012). Ensaio prévios de citotoxicidade realizados por nosso grupo (dados não apresentados), indicam que pseudocistos de *T. vaginalis*, induzidos pela depleção de ferro, apresentam baixa citotoxicidade contra células HeLa ( $\cong 95\%$  menor quando comparados aos trofozoítos), além de limitada plasticidade celular, isto é, baixa capacidade de moldar sua forma.

Após a padronização do protocolo de indução de pseudocistos em *T. vaginalis*, nosso próximo objetivo foi investigar os mecanismos envolvidos na transformação dos trofozoítos em pseudocistos através das mudanças no perfil de

expressão protéica, seja qualitativo ou quantitativo. Dessa forma, a proteômica de larga escala seria a melhor técnica para acompanhar tais alterações uma vez que permite a identificação e quantificação de milhares de proteínas em um único experimento. Neste trabalho, nós empregamos uma abordagem de extração de proteínas com 2% SDS e a preparação pelo MED-FASP, o que permitiu uma análise abrangente de proteínas solúveis e de membrana (Wiśniewski et al. 2009). Além disso, a utilização de duas enzimas (LEP e tripsina) durante a digestão proporcionou a identificação de um grande número de proteínas e uma grande cobertura da sequência (Wiśniewski e Mann 2012).

A análise sem marcação no espectrômetro de massas, seguida pela quantificação por TPA e "Proteomics Ruler" é uma excelente ferramenta para estudar quantitativamente os proteomas, fornecendo estimativas de número de cópias de proteínas por célula sem necessidade de padrões marcados e análise computacional sofisticada, tornando a análise mais interessante em termos de tempo e recursos (Wiśniewski e Rakus 2014). Assim, foi possível estabelecer um mapa proteômico quantitativo de *T. vaginalis*. Interessantemente, mesmo sem qualquer método de fracionamento específico, para obtenção de organelas ou proteínas específicas, conseguimos identificar 459 proteínas hidrogenossomais, de um total de 575 identificadas até o presente nos trabalhos proteômicos realizados com o isolamento desta organela, o que representa 80% destas proteínas identificadas (Schneider et al. 2011; Rada et al. 2011; Beltrán et al. 2013). No total, foram identificadas no presente trabalho 8050 proteínas. Destas, 2934 proteínas (36%) exibiram mudanças significativas na abundância entre trofozoítos e pseudocistos: 1349 proteínas foram reguladas negativamente em pseudocistos, enquanto 1585 foram reguladas positivamente. As análises funcionais são importantes para compreender os processos moleculares que medeiam a fisiologia celular. A ontologia gênica (GO) pode ser o primeiro passo na interpretação funcional das proteínas. Os termos do GO são definições funcionais hierarquicamente agrupadas para "processo biológico", "função molecular" ou "componente celular" (Schmidt et al. 2014). O GO apresenta um vocabulário estruturado e controlado, o que facilita a interpretação (Ashburner et al. 2000). As análises de ontologias foram realizadas utilizando o banco de dados de *Trichomonas* (trichdb). Neste caso, o enriquecimento de termos do GO leva em consideração as anotações funcionais dos genes de *T. vaginalis*. Assim, o número de proteínas

identificadas com determinado termo em relação ao número de proteínas que apresentam anotação para aquele termo constitui o enriquecimento. Outra análise funcional importante é o estudo das vias metabólicas em que proteínas que foram reguladas estão presentes. Uma via metabólica descreve uma série de reações químicas que culminam em um efeito biológico observável. O banco de dados de vias metabólicas apresenta proteínas envolvidas na reação química e aquelas que possuem influência regulatória (Schmidt et al. 2014).

As primeiras análises funcionais realizadas neste estudo foram ontologia gênica e busca no banco de dados de vias metabólicas. A análise das vias do KEGG revelou que em pseudocistos induzidos pela depleção de ferro, proteínas reguladas positivamente pertencem principalmente a endocitose, glicólise/gliconeogênese, reparo de excisão de nucleotídeos, proteólise mediada por ubiquitina e interações de proteínas solúveis que se ligam à NSF (SNARE) no transporte vesicular. Além disso, os processos biológicos de proteólise, processo metabólico de carboidratos, transdução de sinal intracelular, transporte citoplasmático, enovelamento de proteínas, resposta ao estímulo, adesão celular e proteínas de formação dos centros [FeS] também foram enriquecidos. Com as informações obtidas nestas análises funcionais foi possível aprofundar o estudo dos seguintes processos: metabolismo energético, formação dos centros [FeS], adesão celular, o sistema ubiquitina proteassoma (UPS), remodelamento do citoesqueleto, maquinaria quinases-fosfatases e divisão celular.

Por outro lado, a análise das vias do KEGG revelou que em pseudocistos induzidos pela depleção de ferro, as proteínas que apresentaram uma diminuição significativa da abundância pertencem à biogênese do ribossomo em eucariotos, via de vigilância de mRNA, glicólise/gliconeogênese, biossíntese de aminoacil-tRNA. De acordo com esta análise, a ferramenta de enriquecimento da ontologia genética no TrichDB revelou que a atividade da aminoacil-tRNA-ligase e constituinte estrutural do ribossomo eram termos enriquecidos entre as proteínas que tiveram sua abundância reduzida. Além disso, os processos biológicos de tradução, processo metabólico de carboidratos e processo metabólico de tRNA também estavam enriquecidos. Alterações drásticas na síntese protéica de pseudocistos, sua baixa atividade metabólica e o fato de serem formas sem motilidade, sustentam a idéia de que os pseudocistos são a forma não-replicativa de *T. vaginalis* em condições de



depleção de ferro como observado no nosso estudo anterior (Dias-Lopes et al. 2017).

O metabolismo energético sofreu uma drástica alteração nos pseudocistos. Como as enzimas da via de glicólise são codificadas por múltiplas cópias de genes parálogos (Horváthová et al. 2012, Beltrán et al. 2013; Fang et al. 2015), algumas enzimas apresentaram isoformas que tiveram sua abundância aumentada enquanto outras diminuídas nos pseudocistos. Estas alterações de diferentes isoformas de uma determinada enzima foram observadas em outros trabalhos em que os parasitos de *T. vaginalis* foram submetidos às condições de estresse como restrição de ferro, de glicose e diminuição de temperatura (Horváthová et al. 2012, Beltrán et al. 2013; Huang et al. 2014; Fang et al. 2015). Por isso, é importante destacar que a duplicação de diversas famílias gênicas, juntamente com a capacidade de regular genes individuais em diferentes estímulos ambientais, constitui uma vantagem deste parasito para sobreviver em um ambiente com ocorrência de fatores adversos como o sistema imunológico do hospedeiro, alterações fisiológicas durante o ciclo menstrual, diminuição na disponibilidade de nutrientes (particularmente de ferro e lipídeos) e alterações na densidade da microbiota.

De forma geral, as enzimas envolvidas na produção de piruvato e malato, que são os produtos metabólicos enviados para o hidrogenossomo para produção de ATP, foram significativamente reduzidas em pseudocistos. Enquanto duas isoformas da lactato desidrogenase aumentaram drasticamente nesta forma. Estes resultados foram corroborados por um ensaio bioquímico realizado, em que dosamos a atividade da lactato desidrogenase com um kit comercial, e foi comprovado o aumento da atividade da lactato desidrogenase em pseudocistos induzidos pela depleção de ferro. Tal resultado é interessante visto que o aumento na conversão de piruvato para lactato também foi observada em cepas de *T. vaginalis* resistentes ao metronidazol (Kulda et al. 1993; Rasoloson et al. 2002). Como a ativação destes compostos derivados do nitroimidazol ocorre no hidrogenossomo, uma maior produção de lactato e uma redução na produção de malato poderiam favorecer a resistência de pseudocistos ao tratamento convencional. Além da mudança no metabolismo energético, cepas altamente resistentes ao metronidazol mostraram aumento na aderência a tubos e placas de cultura, em comparação com suas cepas parentais suscetíveis a metronidazol (Dunne et al. 2003). A capacidade aumentada de adesão destas cepas poderia estar associada com adesinas. *T. vaginalis* possui

proteínas “moonlighting”, às quais apresentam múltiplas funções em compartimentos celulares distintos (Moreno-Brito et al. 2005; Meza-Cervantez et al. 2011). A enzima málica, PFO e succinato tioquinase, denominadas como adesinas AP65, AP120 e AP33, respectivamente, desempenham importante papel na adesão às células hospedeiras (Garcia et al. 2003; Alderete et al. 2004; Moreno-Brito et al. 2005; Garcia e Alderete 2007; Meza-Cervantez et al. 2011). Além destas enzimas do metabolismo hidrogenossomal, recentemente foi descrito que triose-fosfato isomerase, uma enzima importante no metabolismo da glicose, também está associada à superfície celular sob condições de altas concentrações de glicose e medeia a ligação específica à lamina e fibronectina (Miranda-Ozuna et al. 2016). A localização de enzimas hidrogenossomais na membrana plasmática é controversa, uma vez que não apresentam peptídeo sinal para endereçamento e domínios transmembranas (Hirt et al. 2007). Para explicar este fenômeno, foi proposto um possível mecanismo via autofagia dos hidrogenossomos (Meza-Cervantez et al. 2011). Como *T. vaginalis* apresenta proteínas relacionadas à autofagia (ATG) (Hirt et al. 2007; Carlton et al. 2010), é possível que um sinal de estresse, por exemplo, em altas concentrações de ferro, como no caso da PFO, poderiam provocar um remodelamento do citoesqueleto e a renovação de organelas (Meza-Cervantez et al. 2011). A análise proteômica realizada demonstrou aumento na abundância de duas proteínas ATG que juntamente com observações de vacúolos autofágicos por microscopia eletrônica de transmissão (dados não mostrados) poderia sugerir que este processo esteja ocorrendo nos pseudocistos induzidos pela depleção de ferro e seria responsável pelo aumento de quatro adesinas identificadas no trabalho. Estas adesinas juntamente com outras proteínas relacionadas à adesão, que discutimos no manuscrito, poderiam compensar a falta de motilidade e preservar uma certa capacidade de adesão às células no epitélio urogenital. De fato, nós demonstramos que os pseudocistos induzidos pela depleção de ferro preservam sua capacidade de adesão às células hospedeiras (HeLa e VEC), mas em menor grau que os trofozoítos.

Além das mudanças nas proteínas hidrogenossomais relacionadas ao metabolismo energético, as proteínas envolvidas na montagem dos centros de [FeS] tiveram um aumento drástico na sua abundância em pseudocistos induzidos pela depleção de ferro. Este fenômeno foi observado também em estudos com parasitos de *T. vaginalis* e *T. foetus* submetidos à condições de restrição de ferro (Vaňáčová

et al., 2001; Horváthová et al. 2012; Beltrán et al. 2013). A maquinaria biossintética de formação dos centros [Fe-S] em *T. vaginalis* é similar à de eucariotos mitocondriados (Mühlenhoff et al. 2003; Sutak et al. 2004). Todas as proteínas já descritas desta maquinaria foram observadas e as concentrações destas proteínas aumentaram nos pseudocistos induzidos pela depleção de ferro, com exceção de duas ferredoxinas. Porém, como estas proteínas participam, tanto do metabolismo energético quanto da formação dos centros de [FeS], transferindo elétrons, é provável que estas ferredoxinas (Fdx 1 e 2) que apresentaram diminuição na abundância participem da via energética do metabolismo que foi reduzida nos pseudocistos. O aumento drástico nas proteínas responsáveis pela formação dos centros de [FeS] foi corroborado pela análise de GO que mostrou um enriquecimento de 15 vezes deste processo biológico. Apesar deste aumento, as proteínas hidrogenossomais que apresentam estes centros de [FeS] estão diminuídas nos pseudocistos em condições de restrição de ferro, o que parece contraditório. Esta regulação positiva das proteínas de formação de centros de [FeS] concomitante com a diminuição das proteínas que possuem estes centros de [FeS] foi observada em trabalhos anteriores em que *T. vaginalis* foi submetido à restrição de ferro e estresse por variação de temperatura (Sutak et al. 2004; Dolezal et al. 2007, Beltran et al. 2013; Fang et al. 2015). Uma possível explicação seria a de que estes genes possuem um mecanismo de regulação em comum (Horváthová et al. 2012; Beltrán et al. 2013). Este mecanismo seria composto por proteínas Myb e motivos reguladores de Myb localizados na região 5'-não transcrita dos genes destas proteínas da via de formação dos centros de [Fe-S] (Ong et al. 2006; Hsu et al. 2009; Horváthová et al. 2012; Beltrán et al. 2013). Três proteínas Myb foram identificadas e poderiam ser responsáveis, individualmente ou em conjunto, na regulação dos componentes desta maquinaria. É importante ressaltar ainda que trabalhos anteriores demonstraram que o ferro é capaz de regular a expressão de proteínas Myb (Ong et al. 2007; Horváthová et al. 2012).

A abordagem proteômica utilizada demonstrou uma diminuição de quatro vezes na abundância da proteína quinase A (TVAG\_177140). Hsu e colaboradores (2014) demonstraram que o ferro regula a produção de cAMP através da proteína G e ativa esta proteína quinase A induzindo a translocação do fator de transcrição Myb3 para o núcleo. Assim, o aumento na disponibilidade do ferro induz o influxo nuclear imediato de Myb3 em *T. vaginalis*, indicando que o parasito responde

rapidamente às mudanças no ambiente do hospedeiro (Hsu et al. 2012). Embora os mecanismos regulatórios específicos da expressão dessa enzima em pseudocistos induzidos por depleção de ferro não foram demonstrados em nosso trabalho, a alteração em sua abundância poderia alterar o influxo de Myb3, contribuindo conseqüentemente para as alterações drásticas na expressão de outras proteínas aqui identificadas.

Neste trabalho foram identificadas proteínas correspondentes a todas subunidades do complexo proteassoma. De forma geral, as subunidades das partículas reguladoras apresentaram um aumento significativo nos pseudocistos. Além disso, a via de proteólise mediada pela ubiquitinação também foi positivamente regulada, sugerindo que esta via ubiquitina-proteassoma desempenha um papel importante na transformação de trofozoítos em pseudocistos. Nossos resultados estão de acordo com estudos em *T. foetus*, os quais demonstraram que a atividade do proteassoma aumenta durante a formação do pseudocisto e que os inibidores do proteassoma, como a gliotoxina, induzem a transformação de pseudocistos irreversíveis (Pereira-Neves et al. 2015, 2016). Adicionalmente, o proteassoma apresenta um papel importante durante o encistamento de *Giardia lamblia*, quando ocorre uma intensa redistribuição subcelular destes complexos para a proximidade das vesículas de encistamento (Nino et al. 2013; Sinha et al. 2015; Stefanic et al. 2006). É interessante destacar que os inibidores do proteassoma causam uma diminuição significativa na viabilidade dos cistos de *G. lamblia*, provavelmente por defeitos na maturação da parede celular (Nino et al. 2013). Em *Entamoeba sp.*, os inibidores de proteassoma impedem o crescimento e encistamento do parasito (Makioka et al. 2002). Como a via ubiquitina-proteassoma é necessária para o ciclo celular e para transformação de trofozoítos em pseudocistos, possivelmente a degradação de determinadas proteínas relacionadas com controle do ciclo celular e regulação do citoesqueleto são responsáveis pelas mudanças morfológicas e ultraestruturais bem como a parada da divisão celular observadas nos pseudocistos induzidos pela depleção de ferro.

Estudos prévios mostraram modificações do citoesqueleto durante a transformação de trofozoítos e pseudocistos, como a internalização dos flagelos e mudanças morfológicas do axóstilo e da costa (Granger et al. 2000; Pereira-Neves et al. 2003; De Jesus et al. 2007a; Andrade Rosa et al. 2015). Alguns autores sugeriram que os flagelos são internalizados por um processo de endocitose

mediado por receptores (Granger et al. 2000; Pereira-Neves et al. 2003). De fato, a via do KEGG de endocitose apresenta 21 proteínas com abundância alterada em pseudocistos induzidos pela depleção de ferro, dentre estas, proteínas de citoesqueleto e proteínas relacionadas com transporte vesicular. Destas proteínas, 14 proteínas tiveram sua abundância aumentada. Em *T. vaginalis* este sistema endomembranar é complexo. O sistema de transporte de vesículas está relacionado com os processos de endocitose, fagocitose e autofagia (Carlton et al. 2010). SNARES e Rab GTPases são reguladoras-chave neste processo de transporte intracelular e ocorrem em grandes famílias em genomas de eucariotos (Bock et al. 2001). As GTPases Rab5 e Rab7 são importantes para endossomos iniciais e tardios (Rink et al. 2005). Nas nossas análises foram identificadas três Rab5, duas Rab7 e 22 proteínas relacionadas com SNARE com abundância aumentada nos pseudocistos induzidos pela depleção de ferro. Vale ressaltar que proteínas Pmp e BspA-like podem apresentar sinais clássicos para endocitose (Hirt et al. 2007) e o aumento na abundância destas proteínas poderia estar relacionado com a endocitose do flagelo. Estes dados devem ser explorados posteriormente, uma vez que diferentemente de parasitos de *T. vaginalis* submetidos à baixa temperatura (4°C), que apresentam a forma arredondada, mas não internalizam os flagelos, os pseudocistos induzidos pela depleção de ferro apresentam todos os flagelos no interior da célula. Assim, estudos serão necessários para compreender os principais mecanismos envolvidos na sinalização e internalização dos flagelos.

Nossas análises também mostraram um aumento significativo de 50 vezes na abundância da proteína da família 4-carboximuconolactona descarboxilase 1 (CMD1). O aumento seja na transcrição ou tradução deste gene foi observado em diferentes condições de estresse, como depleção de ferro, tratamento com baixa temperatura e restrição de glicose (Horváthová et al. 2012; Huang et al. 2014; Fang et al. 2015). Recentemente foi demonstrado que parasitos cultivados sob condições de depleção de ferro exibiram um aumento substancial na expressão de CMD1 concomitantemente à redução de células na fase G1/S, e aumento no número de células em G2/M (Cheng et al. 2017). Este trabalho também mostrou que durante o ciclo celular, a proteína aumenta sua abundância e passa a se localizar no corpo basal, por isso, os autores sugerem que está relacionada à regulação da progressão do ciclo celular, particularmente com a citocinese (Cheng et al. 2017). Nas nossas análises, além do aumento da CMD1 nós identificamos proteínas da família STE

quinases relacionadas com a regulação do ciclo celular mitótico. Estas quinases estão envolvidas nas cascatas de MAP quinases que são responsáveis pela resposta celular à sinais externos como condições de estresse (Qi e Elion 2005). De fato, as STE quinases apresentam cascata de sinalização de proteína quinase ativada por estresse na sua anotação de processo biológico, o que faz sentido em relação ao estresse nutricional para indução dos pseudocistos. Assim, poderíamos especular que estas proteínas, no caso de pseudocistos induzidos por depleção de ferro, são essenciais na sinalização para interrupção da divisão celular, o que explicaria o fenótipo não proliferativo que observamos nestas formas.

Nossos dados mostram diferenças expressivas entre trofozoítos e pseudocistos induzidos pela depleção de ferro na via da glicólise, sistema ubiquitina-proteassoma, reorganização do citoesqueleto e proteínas envolvidas na adesão. Estes resultados reforçam observações anteriores de que pseudocistos são formas sem motilidade, não proliferativos e com metabolismo diminuído, porém viáveis, reversíveis e capazes de aderirem às células hospedeiras. Estas características reforçam nossa hipótese sobre a participação de pseudocisto como forma intermediária no ciclo de vida de *T. vaginalis*. O aumento de um subgrupo de proteínas importantes para adesão, reforça as observações *in vitro* de que pseudocisto é capaz de aderir às células epiteliais do hospedeiro, o que *in vivo* poderia evitar que fossem carreadas no fluxo vaginal, mantendo assim a colonização no hospedeiro. O fato de apresentarem um metabolismo menos glicolítico e com diminuição dos produtos metabolizados no hidrogenossomo, teria implicações na refratariedade ao metronizadol. Como os derivados nitroimidazóis são metabolizados nesta organela, produzindo a forma molecular ativa contra o parasito, a ausência ou diminuição do metabolismo hidrogenossomal em pseudocistos poderia torná-los resistentes ao metronidazol. Este seria um importante mecanismo (adicional àqueles de resistência aeróbica e anaeróbica, já sugeridos por outros autores) que teria grande implicação nos casos clínicos de resistência ao metronidazol, já que pseudocistos também são observados no hospedeiro humano.

## 6 PERSPECTIVAS

- Aprofundar as análises de interação de pseudocistos induzidos pela depleção de ferro com células epiteliais humanas para avaliar a capacidade citotóxica e de adesão;

- Investigar o efeito dos derivados de 5-nitroimidazóis em pseudocistos induzidos pela depleção do ferro, a fim de verificar a hipótese de “resistência por baixa atividade hidrogenossomal” nessas formas;

- Aprofundar as análises do processo de autofagia em pseudocistos induzidos pela depleção de ferro e investigar sua relação com comportamento das proteínas “moonlight” no metabolismo e na adesão de trofozoítos e pseudocistos.

## 7 CONCLUSÕES

- A depleção de ferro induz transformações morfológicas de trofozoítos multiplicativos típicos em pseudocistos arredondados, não proliferativos e sem motilidade;
- Pseudocistos de *T. vaginalis* induzidos por depleção de ferro são formas viáveis e reversíveis;
- Pseudocistos induzidos pela depleção de ferro são capazes de interagir e aderir às células epiteliais humanas, mantendo a forma arredondada;
- Pseudocistos induzidos pela depleção de ferro apresentam um ajuste metabólico para um fenótipo menos glicolítico;
- A maquinaria de formação de centros [FeS] exibe substancial regulação positiva em pseudocistos induzidos pela depleção de ferro;
- As partículas reguladoras do proteassoma são significativamente aumentadas em pseudocistos induzidos pela depleção de ferro;
- Proteínas envolvidas na adesão e reorganização do citoesqueleto são significativamente alteradas em pseudocistos induzidos pela depleção de ferro;
- A interrupção do ciclo na fase G2/M em pseudocistos poderia estar associada com alterações na abundância de proteínas reguladoras do ciclo celular.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abonyi A. Examination of nonflagellate and flagellate round forms of *Trichomonas vaginalis* by transmission electron microscopy. *Appl Parasitol* 1995;36(4):303-10.

Addis MF, Rappelli P, Fiori PL. Host and tissue specificity of *Trichomonas vaginalis* is not mediated by its known adhesion proteins. *Infect Immun* 2000;68(7):4358–60.

Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 2012; 59(5):429–93

Afzan MY, Suresh K. Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia. *Parasitol Res* 2012;111(1):371-81.

Alderete JF, Garza GE. Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces. *Infect Immun* 1985;50(3):701-8.

Alderete JF, Nguyen J, Mundodi V, Lehker, MW. Heme-iron increases levels of AP65-mediated adherence by *Trichomonas vaginalis*. *Microb Pathog* 2004;36(5):263-271.

Alvarez-Sanchez ME, Avila-Gonzalez L, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LV, Ortega-Lopez J, et al. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathog* 2000;28:193–202.

Amin A, Bilic I, Liebhart D, Hess M. Trichomonads in birds - a review. *Parasitology* 2014;141:733–47.

Andrade Rosa I, Caruso MB, Oliveira Santos E, Gonzaga L, Zingali RB, Vasconcelos ATR, Benchimol M. The costa of trichomonads: A complex macromolecular cytoskeleton structure made of uncommon proteins. *Biol Cell* 2017;109(6):238-253.

Andrade Rosa I, De Souza W, Benchimol M. Changes in the structural organization of the cytoskeleton of *Trichomonas foetus* during trophozoite-pseudocyst transformation. *Micron* 2015;73:28–35.

Ardalan S, Lee BC, Garber GE. *Trichomonas vaginalis*: the adhesins AP51 and AP65 bind heme and hemoglobin. *Exp Parasitol* 2009;121(4):300–306.

Arike L, Valgepea K, Peil L, Nahku R, Adamberg K, Vilu R. Comparison and applications of label-free absolute proteome quantification methods on *Escherichia coli*. *J Proteomics* 2012; 75:5437–48.

- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 2000;25(1):25.
- Bastida-Corcuera FD, Okumura CY, Colocoussi A, Johnson PJ. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. *Eukaryot Cell* 2005; 4:1951–8.
- Beltrán NC, Horváthová L, Jedelský PL, Šedinová M, Rada P, Marcinčíková M, Hrdý I, Tachezy J. Iron-induced changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *PLoS One* 2013;8(5):e65148.
- Benchimol M, Batista C, De Souza W. Fibronectin- and laminin mediated endocytic activity in the parasitic protozoa *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1990;22(1):39–45.
- Benchimol M, de Almeida LG, Vasconcelos AT, de Andrade Rosa I, Bogo MR, Kist LW, de Souza W. Draft genome sequence of *Tritrichomonas foetus* strain K. *Genome Announc* 2017;5(16):e00195-17.
- Benchimol M, De Andrade Rosa I, da Silva Fontes R, Burla Dias AJ. *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitol Res* 2008;102(4):597-604.
- Benchimol M, Ribeiro KC, Mariante RM, Alderete JF. Structure and division of the Golgi complex in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Eur J Cell Biol* 2001;80(9):593-607.
- Benchimol M. Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue Cell* 2009;41:151- 68.
- Benchimol M. New ultrastructural observations on the skeletal matrix of *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res* 2005;97(5):408-16.
- Benchimol M. The hydrogenosome as a drug target. *Curr Pharm Des* 2008;14(9):872-81.
- Benchimol M. The mastigont system in trichomonads. In *Structures and Organelles in Pathogenic Protists* (pp. 1-26). 2010. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Benchimol M. Trichomonads under microscopy. *Microsc Microanal* 2004;10:528-50.
- Bock JB, Matern HT, Peden AA, Scheller RH. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 2001;409(6822):839.

Boxma B, Ricard G, van Hoek AH, Severing E, Moon-van der Staay SY, van der Staay GW et al. The [FeFe] hydrogenase of *Nyctotherus ovalis* has a chimeric origin. *BMC Evol Biol* 2007;7(1):230.

Brotman RM, Bradford LL, Conrad M, Gajer P, Ault K, Peralta L, Forney LJ, Carlton JM, Abdo Z, Ravel, J. Association between *Trichomonas vaginalis* and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. *Sex Transm Dis* 2012;39(10):807.

Brugerolle G. Étude de la cryptopleuromitose et de la morphogenèse de division chez plusieurs genres de la trichomonadines primitive. *Protistologica* 1975;4:457–68.

Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, et al. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 2007;315(5809):207-12.

Carlton JM, Malik SB, Sullivan SA, Sicheritz-Ponten T, Tang P, Hirt RP. *Anaerobic Parasitic Protozoa: Genomics and Molecular Biology*. 2010. Norfolk: Caister Academic Press, pp. 119–156.

Castro C, Menna-Barreto RFS, Fernandes NDS, Saboia-Vahia L, Dias-Lopes G, Britto C, Cuervo P, De Jesus JB. Iron-modulated pseudocyst formation in *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology* 2016;143(8):1034-42.

Catherman AD, Skinner OS, Kelleher NL. Top down proteomics: facts and perspectives. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;445(4): 683-93.

Cavalier-Smith T. Early evolution of eukaryote feeding modes, cell structural diversity, and classification of the protozoan phyla Loukozoa, Sulcozoa, and Choanozoa. *Eur J Protistol* 2013;49(2):115-78.

Cerkasovová A, Čerkasov J, Kulda J. Metabolic differences between metronidazole resistant and susceptible strains of *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol* 1984;11:105-118.

Chapman A, Cammack R, Linstead D, Lloyd D. The generation of metronidazole radicals in hydrogenosomes isolated from *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology* 1985;131(9):2141-4.

Cheng WH, Huang KY, Huang PJ, Lee CC, Yeh YM, Ku FM, Lin R, Cheng ML, Chiu CH, Tang P.  $\gamma$ -Carboxymuconolactone decarboxylase: a novel cell cycle-related basal body protein in the early branching eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Parasit Vectors* 2017;10(1):443.

Cobo ER, Cano D, Rossetti O, Campero CM. Heifers immunized with whole-cell and membrane vaccines against *Tritrichomonas foetus* and naturally challenged with an infected bull. *Vet Parasitol* 2002;109(3-4):169-84.

Collingridge PW, Brown RW, Ginger ML. Moonlighting enzymes in parasitic protozoa. *Parasitology* 2010;137(9):1467–75.

Conrad MD, Gorman AW, Schillinger JA, Fiori PL, Arroyo R, Malla N, Dubey ML, Gonzalez J, Blank S, Secor WE, Carlton JM. Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(3):e1573.

Costa e Silva-Filho F, de Souza W, Lopes JD. Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(21):8042-6.

Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* 2014;13(9):2513-26.

Crouch ML, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin. *Microbiology* 1999;145(10):2835-43.

Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber GE. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(4):783-93.

Cudmore SL, Garber GE. Prevention or treatment: the benefits of *Trichomonas vaginalis* vaccine. *J Infect and Public Health* 2010;3(2):47-53.

Cuervo P, Cupolillo E, Britto C, González LJ, Silva-Filho FC, Lopes LC, Domont GB, De Jesus JB. Differential soluble protein expression between *Trichomonas vaginalis* isolates exhibiting low and high virulence phenotypes. *J Proteomics* 2008;71(1):109-22.

Dacks JB, Walker G, Field MC. Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitol International* 2008;57(2):97-104.

De Jesus JB, Cuervo P, Britto C, Sabóia-Vahia L, Costa E Silva-Filho F, Borges-Veloso A, Barreiros Petrópolis D, Cupolillo E, Barbosa Domont G. Cysteine peptidase expression in *Trichomonas vaginalis* isolates displaying high- and low-virulence phenotypes. *J Proteome Res* 2009;8(3):1555-64.

De Jesus JB, Cuevo P, Junqueira M, Britto C, Silva-Filho FC, Soares MJ. A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics* 2007a;7:1961–72.

De Jesus JB, Cuervo P, Junqueira M, Britto C, Silva-Filho FC, Saboia-Vahia L, González LJ, Domont GB. Application of two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for proteomic analysis of the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *J Mass Spectrom* 2007b;42(11):1463-73.

De Jesus JB, Ferreira MA, Cuervo P, Britto C, Costa e Silva-Filho F, Meyer-Fernandes JR. Iron modulates ectophosphohydrolase activities in pathogenic trichomonads. *Parasitol Int* 2006;55(4):285-90.

De Jesus JB, Vannier-Santos MA, Britto C, Godefroy P, Silva-Filho FC, Pinheiro AAS, Rocha-Azevedo B, Lopes AHCS, Meyer-Fernandes JR. *Trichomonas vaginalis* virulence against epithelial cells and morphological variability: the comparison between a well-established strain and a fresh isolate. *Parasitol Res* 2004;93(5):369-77.

de Miguel N, Lustig G, Twu O, Chattopadhyay A, Wohlschlegel JA, Johnson PJ. Proteome analysis of the surface of *Trichomonas vaginalis* reveals novel proteins and strain-dependent differential expression. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(7):1554-66.

Dias-Lopes G, Saboia-Vahia L, Margotti ET, Fernandes NS, Castro CLF, Junior FOO, Peixoto JF, Britto C, Silva-Filho FC, Cuervo P, De Jesus JB. Morphologic study of the effect of iron on pseudocyst formation in *Trichomonas vaginalis* and its interaction with human epithelial cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2017;112(10):664-73.

Doerr A. Mass spectrometry-based targeted proteomics. *Nat Methods* 2013;10(1):23.

Dolezal P, Dancis A, Lesuisse E, Sutak R, Hrdý I, Embley TM, Tachezy J. Frataxin, a conserved mitochondrial protein, in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell* 2007;6(8):1431-8.

Dunne RL, Linda AD, Upcroft P, O'donoghue PJ, Upcroft JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res* 2003;13(4):239.

Ebhardt HA, Root A, Sander C, Aebersold R. Applications of targeted proteomics in systems biology and translational medicine. *Proteomics* 2015;15(18):3193-3208.

- Erde J, Loo RRO, Loo JA. Enhanced FASP (eFASP) to increase proteome coverage and sample recovery for quantitative proteomic experiments. *J Proteome Res* 2014;13(4):1885-95.
- Fang YK, Huang KY, Huang PJ, Lin R, Chao M, Tang P. Gene-expression analysis of cold-stress response in the sexually transmitted protist *Trichomonas vaginalis*. *J Microbiol Immunol Infect* 2015;48(6):662-75.
- Farmer MA. Ultrastructure of *Ditrichomonas honigbergii* n. g., n. sp. (Parabasalia) and its relationships to amitochondrial protists. *J Eukaryot Microbiol* 1993;40(5):619–26.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246(4926):64-71.
- Figuroa-Angulo EE, Calla-Choque JS, Mancilla-Olea MI, Arroyo, R. RNA-binding proteins in *Trichomonas vaginalis*: atypical multifunctional proteins. *Biomolecules* 2015;5(4):3354-95.
- Friedhoff KT, Kuhnigk C, Müller I. Experimental infections in chicken with *Chilomastix gallinarum*, *Tetratrichomonas gallinarum*, and *Tritrichomonas eberthi*. *Parasitol Res* 1991;77(4):329–34.
- Fürnkranz U, Henrich B, Walochnik J. Mycoplasma hominis impacts gene expression in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* 2018;117(3):841-7.
- Garber GE, Lemchuk-Favel LT, Bowie WR. Isolation of a cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1989;27:1548–53.
- Garber GE, Lemchuk-Favel LT. Association of production of cell-detaching factor with the clinical presentation of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1990; 28(11):2415-2417.
- Garcia AF, Alderete JF. Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *BMC Microbiol* 2007;7(1):116.
- Garcia, A. F.; Chang, T. H.; Benchimol, M.; Klumpp, D. J.; Lehker, M. W.; Alderete, J. F. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* 2003;47(5):1207-24.
- Gould SB, Woehle C, Kusdian G, Landan G, Tachezy J, Zimorski V, Martin WF. Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *Int J Parasitol* 2013;43(9):707-19.

- Granger BL, Warwood SJ, Benchimol M, De Souza W. Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res* 2000;86(9):699–709.
- Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66(1):39-63.
- Hebert AS, Richards AL, Bailey DJ, Ulbrich A, Coughlin EE, Westphall MS, Coon JJ. The one hour yeast proteome. *Mol Cell Proteomics* 2014;13(1):339-47.
- Hernández HM, Marcet R, Sarracent J. Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasite* 2014;21:54.
- Hernández-Gutiérrez R, Avila-González L, Ortega-López J, Cruz-Talonia F, Gómez-Gutiérrez G, et al. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Exp Parasitol* 2004;107:125–35.
- Hernández-Gutiérrez R, Ortega-López J, Arroyo R. A 39-kDa Cysteine proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal cytotoxicity. *J Euk Microbiol* 2003;50:696–8.
- Hirt RP, Noel CJ, Sicheritz-Pontén T, Tachezy J, Fiori PL. *Trichomonas vaginalis* surface proteins: a view from the genome. *Trends Parasitol* 2007;23(11):540-7.
- Hirt RP. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: An integrative overview. *Sex Transm Infect* 2013;89:439–43.
- Honigberg BM, Brugerolle G. Structure in trichomonads parasitic in humans. In *Trichomonas Parasitic in Humans* (ed. Honigberg, B. M.), 1990. Springer-Verlag, New York. pp. 5–35.
- Honigberg BM, Mattern CF, Daniel WA. Fine structure of the mastigont system in *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller). *J Protozool* 1971;18:183-98.
- Horváthová L, Šafaříková L, Basler M, Hrdý I, Campo NB, Shin JW, Huang KY, Huang PJ, Lin R, Tang P, Tachezy J. Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *Trichomonas vaginalis* genome. *Genome Biol Evol* 2012;4(10):1017-29.
- Hsu HM, Lee Y, Hsu PH, Liu HW, Chu CH, Chou YW, Chen YR, Chen SH, Tai JH. Signal transduction triggered by iron to induce the nuclear importation of a myb3 transcription factor in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem* 2014;289(42):29334-49.

- Hsu HM, Lee Y, Indra D, Wei SY, Liu HW, Chang LC, Chen C, Ong SJ, Tai JH. Iron-inducible nuclear translocation of a Myb3 transcription factor in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell* 2012;11(12):1441-50.
- Hsu HM, Ong SJ, Lee MC, Tai JH. Transcriptional regulation of an iron-inducible gene by differential and alternate promoter entries of multiple Myb proteins in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell* 2009;8(3):362-72.
- Huang KY, Chen YYM, Fang YK, Cheng WH, Cheng CC, Chen YC, et al. Adaptive responses to glucose restriction enhance cell survival, antioxidant capability, and autophagy of the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840(1):53–64.
- Huang KY, Chien KY, Lin YC, Hsu WM, Fong IK, Huang PJ, Yueh YM, Gan RRC, Tang P. A proteome reference map of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* 2009;104(4):927.
- Huang KY, Huang PJ, Ku FM, Lin R, Alderete JF, Tang P. Comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Trichomonas vaginalis* following adherence to fibronectin. *Infect Immun* 2012;80(11):3900-11.
- Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, Mann M. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* 2005;4(9):1265-72.
- Johnston VJ, Mabey DC. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21(1), 56-64.
- Khoshnan A, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* with a double-stranded RNA virus has upregulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. *J Virol* 1994;68(6):4035-8.
- Kingston MA, Bansal D, Carlin EM. 'Shelf life' of *Trichomonas vaginalis*. *Int J STD AIDS* 2003;14(1):28-9.
- Kissinger P. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infect Dis* 2015;15(1):307.
- Kulda J, Tachezy J, Cerkasovova A. In vitro induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *J Eukaryot Microbiol* 1993;40(3):262–9.
- Kulda J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int J Parasitol* 1999;29(2):199–212.



Kusdian G, Gould SB. The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. *Mol Biochem Parasitol* 2014;198(2):92-9.

Kusdian G, Woehle C, Martin WF, Gould SB. The actin-based machinery of *Trichomonas vaginalis* mediates flagellate-amoeboid transition and migration across host tissue. *Cell Microbiol* 2013, 15(10):1707-21.

Lehker MW, Chang TH, Dailey DC, Alderete JF. Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. *J Exp Med* 1990; 171(6):2165-70.

Lehker MW, Sweeney D. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sex Transm Infect* 1999;75(4):231-8.

Leprevost FV, Valente RH, Lima DB, Perales J, Melani R, Yates JR et al. PepExplorer: a similarity-driven tool for analyzing de novo sequencing results. *Mol Cell Proteomics* 2014;13(9):2480-9.

Lipman NS, Lampen N, Nguyen HT. Identification of pseudocysts of *Tritrichomonas muris* in Armenian hamsters and their transmission to mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 1999;49(3):313-5.

Lu P, Vogel C, Wang R, Yao X, Marcotte EM. Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nat Biotechnol* 2007;25(1):117.

Madeiro da Costa RF, Benchimol M. The effect of drugs on cell structure of *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res* 2004;92(2):159-70.

Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Parasitol Res* 2002, 88(5):454-9.

Mariante RM, Lopes LC, Benchimol M. *Tritrichomonas foetus* pseudocysts adhere to vaginal epithelial cells in a contact-dependent manner. *Parasitol Res* 2004;92(4): 303-12.

Mattern CF, Daniel WA. *Tritrichomonas muris* in the hamster: pseudocysts and the infection of newborn. *J Eukaryot Microbiol* 1980;27(4):435-9.

Mattern CF, Honigberg BM, Daniel WA. Fine-Structural changes associated with pseudocyst formation in *Trichomitus batrachorum*. *J Eukaryot Microbiol* 1973;20(2):222-9.

McClelland RS, Sangare L, Hassan WM, Lavreys L, Mandaliya K, Kiarie J, Ndinya-Achola J, Jaoko W, Baeten JM. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *J Infect Dis* 2007;195(5):698–702.

Meade JC, Mestral J, Stiles JK, Secor WE, Finley RW, Cleary JD, Lushbaugh WB. Genetic diversity of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates determined by EcoRI restriction fragment length polymorphism of heat-shock protein 70 genes. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80:245–51.

Melo-Braga MB, da Rocha-Azevedo B, Silva-Filho FC. *Tritrichomonas foetus*: the role played by iron during parasite interaction with epithelial cells. *Exp Parasitol* 2003;105(2):111-20.

Mendoza-Lopez MR, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LV, Avila-Gonzalez L, Ruiz-Tachiquin ME, et al. CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect Immun* 2000;68:4907–12.

Meza-Cervantez P, Gonzalez-Robles A, Cardenas-Guerra RE, Lopez JO, Saavedra E, Pineda E, Arroyo R. Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. *Microbiology* 2011;157(12):3469-82.

Midlej V, Benchimol M. *Trichomonas vaginalis* Kills and eats – evidence for phagocytic activity as a cytophatic effect. *Parasitology* 2010;137:65-76.

Miranda-Ozuna JF, Hernández-García MS, Briebe LG, Benítez-Cardoza CG, Ortega-López J, González-Robles A, Arroyo R. 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. *Infect Immun* 2016;84(10):2878-94.

Moreno-Brito V, Yáñez-Gómez C, Meza-Cervantez P, Ávila-González L, Rodríguez MA, Ortega-López J, Gonzalez-Robles A, Arroyo R. A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cell Microbiol* 2005;7(2):245-58.

Mühlenhoff U, Gerber J, Richhardt N, Lill R. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J* 2003;22(18):4815-25.

Müller M, Mentel M, Van Hellemond JJ, Henze K, Woehle C, Gould SB, Yu RY, Giezen MVG, Tielens AGM Martin WF. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Ver* 2012;76(2):444–95.

Nägele E, Vollmer M, Hörth P, Vad C. 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert Rev Proteomics* 2004;1:37–46.

Nelson DE, Van Der Pol B, Dong Q, Revanna KV, Fan B, Easwaran S, Sodergren E, Weinstock GM, Diao L, Fortenberry JD. Characteristic male urine microbiomes associate with asymptomatic sexually transmitted infection. *PLoS One* 2010;5(11): e14116.

Nievas YR, Coceres VM, Midlej V, de Souza W, Benchimol M, Pereira-Neves A, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Johnson PJ, de Miguel N. Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: characterization and their association with cell interaction. *Cell Mol Life Sci* 2017;1-16.

Niño CA, Chaparro J, Soffientini P, Polo S, Wasserman M. Ubiquitination dynamics in the early-branching eukaryote *Giardia intestinalis*. *Microbiologyopen* 2013;2(3):525-39.

Noda S, Mantini C, Meloni D, Inoue JI, Kitade O, Viscogliosi E, Ohkuma M. Molecular phylogeny and evolution of parabasalia with improved taxon sampling and new protein markers of actin and elongation factor-1 $\alpha$ . *PLoS One* 2012;7(1):e29938.

Okumura CY, Baum LG, Johnson PJ. Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell Microbiol* 2008; 10(10):2078–90.

Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, silac, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002;1(5):376-86.

Ong SJ, Hsu HM, Liu HW, Chu CH, Tai JH. Activation of multifarious transcription of an adhesion protein ap65-1 gene by a novel Myb2 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem* 2007;282(9):6716-25.

Ong SJ, Hsu HM, Liu HW, Chu CH, Tai JH. Multifarious transcriptional regulation of adhesion protein gene ap65-1 by a novel Myb1 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell* 2006;5(2):391-9.

Pereira C, Almeida WF. Sobre a verdadeira natureza das “formas ameboides”, dos pretensos “cistos” e formas “degenerativas” no gênero “*Trichomonas* Donné”, 1836. *Arch Inst Biol Andina* 1940;11:347–66.

Pereira-Neves A, Benchimol M. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol Cell* 2007;99(2):87-101.

Pereira-Neves A, Benchimol M. *Tritrichomonas foetus*: budding from multinucleated pseudocysts. *Protist* 2009;160(4):536-51.

Pereira-Neves A, Campero CM, Martínez A, Benchimol M. Identification of *Tritrichomonas foetus* pseudocysts in fresh preputial secretion samples from bulls. *Vet Parasitol* 2011;175(1-2):1-8.

Pereira-Neves A, Gonzaga L, Menna-Barreto RF, Benchimol M. Characterisation of 20S proteasome in *Tritrichomonas foetus* and its role during the cell cycle and transformation into endoflagellar form. *PLoS One* 2015;10(6):e0129165.

Pereira-Neves A, Menna-Barreto RF, Benchimol M. The fungal metabolite gliotoxin inhibits proteasome proteolytic activity and induces an irreversible pseudocystic transformation and cell death in *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res* 2016;115(8):3057-69.

Pereira-Neves A, Nascimento LF, Benchimol M. Cytotoxic effects exerted by *Tritrichomonas foetus* pseudocysts. *Protist* 2012;163(4):529-43.

Pereira-Neves A, Ribeiro KC, Benchimol M. Pseudocysts in trichomonads—new insights. *Protist* 2003;154(3-4):313-29.

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

Provenzano D, Alderete JF. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinase of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1995;63:3388–95.

Qi M, Elion EA. MAP kinase pathways. *J Cell Sci* 2005;118(16):3569-72.

Rada P, Doležal P, Jedelský PL, Bursac D, Perry AJ, Šedinová M, Smíšková K, Novotný M, Beltrán NC, Hrdý I, Lithgow T, Tachezy J. The core components of organelle biogenesis and membrane transport in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *PLoS One* 2011;6(9):e24428.

Rasoloson D, Vanacova S, Tomkova E, Razga J, Hrdý I, Tachezy J, Kulda J. Mechanisms of in vitro development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology* 2002;148(8):2467-77.

Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108(1):4680-87.

Rendón-Maldonado J, Espinosa-Cantellano M, Soler C, Torres JV, Martínez-Palomo A. *Trichomonas vaginalis*: in vitro attachment and internalization of HIV-1 and HIV-1–infected lymphocytes. *J Eukariotic Microbiol* 2003;50(1):43-8.

Rendón-Maldonado JG, Espinosa-Cantellano M, González-Robles A, Martínez-Palomo A. *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Exp Parasitol* 1998;89(2):241-50.

Ribeiro CR, Santos C, Benchimol M. Is *Trichomonas tenax* a parasite or a commensal? *Protist* 2015;166(2):196–210.

Ribeiro KC, Benchimol M, Farina M. Contribution of cryofixation and freeze-substitution to analytical microscopy: a study of the *Tritrichomonas foetus* hydrogenosome. *Microsc Res Tech* 2001; 53(1):87-92.

Ribeiro KC, Henrique Monteiro-Leal L, Benchimol M. Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *J Eukaryot Microbiol* 2000;47(5):481-92.

Ribeiro KC, Pereira-Neves A, Benchimol M. The mitotic spindle and associated membranes in the closed mitosis of trichomonads. *Biol Cell* 2002;94(3):157–72.

Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 2005;122(5):735-49.

Schmidt A, Forne I, Imhof A. Bioinformatic analysis of proteomics data. *BMC Syst Biol* 2014;8(2):S3.

Schneider RE, Brown MT, Shiflett AM, Dyall SD, Hayes RD, Xie Y, Loo JA, Johnson PJ. The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *Int J Parasitol* 2011;41(13-14): 1421-34.

Singh BN, Lucas JJ, Beach DH, Shin ST, Gilbert RO. Adhesion of *Trichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. *Infect Immun* 1999;67:3847–54.

Singh S, Singh G, Sagar N, Yadav PK, Jain PA, Gautam B, Wadhwa G. Insight into *Trichomonas vaginalis* genome evolution through metabolic pathways comparison. *Bioinformatics* 2012;8(4):189.

Sinha A, Datta SP, Ray A, Sarkar S. A reduced VWA domain-containing proteasomal ubiquitin receptor of *Giardia lamblia* localizes to the flagellar pore regions in microtubule-dependent manner. *Parasit. Vectors* 2015;8:120.

Šlapeta J, Craig S, McDonell D, Emery D. *Tritrichomonas foetus* from domestic cats and cattle are genetically distinct. *Exp Parasitol* 2010;126:209-13.

Smith A, Johnson P. Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Res Microbiol* 2011;162(6):646-54.

Smith LM, Kelleher NL. Proteoforms as the next proteomics currency. *Science* 2018;359(6380):1106-7.

Sommer U, Costello CE, Hayes GR, Beach DH, Gilbert RO, Lucas JJ, Singh BN. Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells. *J Biol Chem* 2005;280(25):23853-60.

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

Štáfková J, Rada P, Meloni D, Žárský V, Smutná T, Zimmann N, Harant K, Pompach P, Hrdý I, Tachezy J. Dynamic secretome of *Trichomonas vaginalis*: Case study of  $\beta$ -amylases. *Mol Cell Proteomics* 2018; 17(2):304-20.

Stefanic S, Palm D, Svärd SG, Hehl AB. Organelle proteomics reveals cargo maturation mechanisms associated with Golgi-like encystation vesicles in the early-diverged protozoan *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* 2006, 281(11):7595–604.

Suchan P, Vyoral D, Petrák J, Sut'ák R, Rasoloson D, Nohýnková E, Dolezal P, Tachezy J. Incorporation of iron into *Tritrichomonas foetus* cell compartments reveals ferredoxin as a major iron-binding protein in hydrogenosomes. *Microbiology* 2003;149:1911-21.

Sutak R, Dolezal P, Fiumera HL, Hrdý I, Dancis A, Delgadillo-Correa M, Johnson PJ, Müller M, Tachezy J. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(28):10368-73.

Sutcliffe S, Neace C, Magnuson NS, Reeves R, Alderete JF. Trichomonosis, a common curable STI, and prostate carcinogenesis - a proposed molecular mechanism. *PLoS Pathog* 2012;8(8):e1002801.

Swygard H, Seña AC, Hobbs MM, Cohen MS. Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management. *Sex Transm Infect* 2004;80(2):91-5.

Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuo T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1988;2(8):151-3.

Twu O, de Miguel N, Lustig G, Stevens GC, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Johnson PJ. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host-parasite interactions. *PLoS Pathog* 2013;9(7):e1003482.

Upcroft JA, Dunn LA, Wal T, Tabrizi S, Delgadillo-Correa MG, Johnson PJ, Garland S, Siba P, Upcroft P. Metronidazole resistance in *Trichomonas vaginalis* from highland women in Papua New Guinea. *Sex Health* 2009;6(4):334-8.

Upcroft P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:150–164.

Vaňáčová Š, Rasoloson D, Rázga J, Hrdý I, Kulda J, Tachezy J. Iron-induced changes in pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and involvement of iron in expression of hydrogenosomal proteins. *Microbiology* 2001;147(1):53-62.

Van Der Pol B, Kwok C, Pierre-Louis B, Rinaldi A, Salata RA, Chen PL, van de Wijgert J, Mmiro F, Mugerwa R, Chipato T, Morrison CS. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *J Infect Dis* 2008;197(4):548-54.

Vancini RG, Pereira-Neves A, Borojevic R, Benchimol M. *Trichomonas vaginalis* harboring *Mycoplasma hominis* increases cytopathogenicity in vitro. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27(4):259.

Washburn MP, Wolters D, Yates III JR. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 2001;19:242–7.

Watt L, Jennison RF. Incidence of *Trichomonas vaginalis* in marital partners. *Br J Vener Dis* 1960;36(3):163-6.

Wenrich DH. The morphology of *Trichomonas vaginalis*. *Jubilare Pro Professore Sadao Yoshida Osaka* 1939;2:65–76.

Wiener MC, Sachs JR, Deyanova EG, Yates NA. Differential mass spectrometry: a label-free LC-MS method for finding significant differences in complex peptide and protein mixtures. *Anal. Chem.* 2004;76:6085–96.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a

genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1995;13(1):19-50.

Wiśniewski JR, Hein MY, Cox J, Mann M. A “proteomic ruler” for protein copy number and concentration estimation without spike-in standards. *Mol Cell Proteomics* 2014;13(12):3497-506.

Wiśniewski JR, Mann M. A proteomics approach to the protein normalization problem: selection of unvarying proteins for MS-based proteomics and western blotting. *J Proteome Res* 2016; 15(7), 2321-6.

Wiśniewski JR, Mann M. Consecutive proteolytic digestion in an enzyme reactor increases depth of proteomic and phosphoproteomic analysis. *Anal Chem* 2012;84(6): 2631-7.

Wiśniewski JR, Rakus D. Multi-enzyme digestion FASP and the ‘Total Protein Approach’-based absolute quantification of the *Escherichia coli* proteome. *J Proteomics* 2014;109:322-31.

Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 2009;6(5):359.

Wiśniewski JR, Ostasiewicz P, Dus K, Zielinska DF, Gnad F, Mann M. Extensive quantitative remodeling of the proteome between normal colon tissue and adenocarcinoma *Mol Syst Biol* 2012;8(1):611.

World Health Organization (2012) Global incidence and prevalence of selected sexually transmitted infections— 2008. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Xu WD, Lun ZR, Gajadhar A. Chromosome numbers of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis*. *Vet Parasitol* 1998;78(4):247-51.

Yeh YM, Huang KY, Gan RCR, Huang HD, Wang TCV, Tang P. Phosphoproteome profiling of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *J Microbiol Immunol Infect* 2013;46(5):366-73.

Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates III JR. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev* 2013;113(4):2343-94.

Zubáčová Z, Cimburek Z, Tachezy J. 2008. Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Mol Biochem Parasitol* 2008;161(1):49–54.