

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Caracterização da atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de derivado
dissubstituído de 2,4-diamino-quinazolina: modulação de peptídeos e
morte celular por apoptose-like**

Juliana Inês Weber

Porto Alegre, setembro de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Caracterização da atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de derivado
dissubstituído de 2,4-diamino-quinazolina: modulação de peptídeos e
morte celular por apoptose-like**

**Dissertação apresentada
por Juliana Inês Weber
para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas.**

Juliana Inês Weber

Orientadora: Profa. Dra. Tiana Tasca

Coorientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 01/10/2019 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Karine Zimmer
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dr. Lucélia Santi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Simone Cristina Gnoatto
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Weber, Juliana Inês
Caracterização da atividade anti-Trichomonas vaginalis de derivado dissustituído de 2,4-diamino-quinazolina: modulação de peptídeos e morte celular por apoptose-like / Juliana Inês Weber.
-- 2019.
102 f.
Orientadora: Tiana Tasca.

Coorientador: Saulo Fernandes de Andrade.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Trichomonas vaginalis. 2. Derivados de quinazolina. 3. Peptídeos. 4. Apoptose-like. I. Tasca, Tiana, orient. II. de Andrade, Saulo Fernandes, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente à Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas por me oportunizar um ensino de qualidade.

À CAPES pela bolsa de mestrado que permitiu minha dedicação exclusiva a este trabalho.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite.

À Prof^a Dr. Tiana Tasca pela orientação, ensinamentos, paciência e amizade durante os últimos quase três anos. Obrigada por ter me incentivado durante os dias difíceis e ter compreendido minhas angustias e decisões. Espero um dia ser metade da profissional que és.

Ao Prof. Dr. Saulo Fernandes, pela coorientação e competência científica para realização deste projeto.

Aos queridos amigos do GPTrico que tive a honra de conviver: Micheli, Graziela, Márcia, Luciana, Brenda, Saulo, Carla, Giulia e Fernanda. Vocês fizeram minha rotina muito mais leve e feliz. A todos meus amigos que, de uma forma ou outra, estiveram presentes e me apoiaram durante este período: Fernanda, Thais, Ana, Daniela, Yasmin, Victória, Kamila, Bruna, Eduardo, Raphael e Kelvin.

Ao Samuel, meu namorado, por me apoiar nesta etapa, mesmo estando longe nunca deixou de me incentivar e ajudar em tudo que estivesse ao seu alcance. Obrigada pelo amor, carinho e paciência nos momentos de ausência e de estresse.

Agradeço especialmente a minha família que sempre me incentivou a concretizar o sonho do mestrado. Aos meus pais, Donato e Áurea, que sempre valorizaram a educação e que nunca mediram esforços para que eu realizasse meus sonhos. Muito obrigada por compreender minhas ausências, pelo apoio incansável em todos os momentos e amor incondicional.

RESUMO

Trichomonas vaginalis é um protozoário flagelado responsável pela infecção sexualmente transmissível (IST) curável mais prevalente no mundo, tricomoníase. A tricomoníase gera inúmeras complicações como aumento do risco de desenvolvimento de câncer cervical e de próstata, doença inflamatória pélvica, infertilidade, parto prematuro, baixo peso do recém-nascido, além de aumentar do risco de transmissão e aquisição de HIV/AIDS. A classe aprovada para tratamento da tricomoníase já apresenta casos de resistência, desta forma, é imprescindível a busca por novos compostos para o tratamento. Esse estudo teve como objetivo avaliar e caracterizar a atividade anti-*T. vaginalis* de seis compostos derivados de 2,4-diamino-quinazolina (**PH100**, **PH101**, **PH110**, **PH111**, **PH114** e **PH117**). Dentre os compostos testados, **PH100** mostrou as melhores atividades frente aos isolados de *T. vaginalis* ATCC 30236, cultivado *in vitro* por longos períodos e TV-LACM15, isolado clínico fresco. Esse composto também apresentou os melhores índices de seletividade, tanto para células (tumoriais ou não) quanto para eritrócitos humanos. Além disso, **PH100** apresentou efeito sinérgico quando utilizado com metronidazol, indicando mecanismo de ação diferente do já conhecido por apresentar resistência. Quando avaliado o mecanismo de morte para ATCC 30236, **PH100** mostrou agir por vias semelhantes à apoptose, com externalização de fosfatidilserina através da marcação com Anexina-V, modificações na membrana com observação de protruções através de microscopia eletrônica de varredura, e modulação da expressão gênica de enzimas relacionadas com apoptose em outros organismos, o que não foi observado para TV-LACM15. Outro mecanismo observado para ambos os isolados foi alteração da atividade de peptidases por meio de zimogramas, fato que deve ser avaliado com mais detalhes por espectroscopia de massas e proteoma. Esses resultados indicam que **PH100** é um composto promissor para tratamento da tricomoníase.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*, anti-*T. vaginalis*, quinazolina, apoptose, peptidases.

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is a flagellate protozoan responsible for the most prevalent curable sexually transmitted infection (STI) in the world, trichomoniasis. The infection generates complications such as increased risk of developing cervical and prostate cancer, pelvic inflammatory disease, infertility, premature birth, low birth weight-born, and increase the risk of HIV transmission and acquisition. The class approved for the treatment of trichomoniasis already presents resistance, so it is essential to search for new compounds for treatment. This study aimed to evaluate and characterize anti-*T. vaginalis* activity of six 2,4-diamine-quinazoline derivative compounds. Among the tested compounds, **PH100** showed the best activities against the long-term-grown ATCC 30236 *T. vaginalis* isolate and the fresh clinical isolate TV-LACM15. This compound also presented the best selectivity indexes, for both type of cells (tumor or not) and human erythrocytes. In addition, **PH100** had a synergistic effect when used with metronidazole, indicating a mechanism of action different from that already presenting resistance. When evaluated cell death mechanism for ATCC 30236, **PH100** was shown to act by apoptosis-like pathways, with phosphatidylserine externalization by Annexin-V labeling, modifications on plasmatic membrane with blebbing observation by scanning electron microscopy, and modulation of gene expression of enzymes related to apoptosis in other organisms, that was not observed for TV-LACM15. Another mechanism observed was alteration of peptidases activity by zymograms, a fact that should be evaluated in more detail by mass spectroscopy and proteome. These results indicate that **PH100** is a promising compound for treatment of trichomoniasis.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, anti-*T. vaginalis*, quinazoline, apoptosis, peptidases.

SUMÁRIO

I.	Introdução.....	7
II.	Revisão do tema.....	10
	II.1. <i>Trichomonas vaginalis</i>	11
	II.2. Tricomoníase.....	12
	2.1. Manifestações clínicas.....	12
	2.2. Complicações.....	12
	2.3. Mecanismos de patogenicidade.....	13
	2.4. Tratamento.....	14
	2.5. Resistência.....	15
	II.3. Peptidases.....	16
	II.4. Mecanismos de morte celular.....	17
	II.5. Derivados de quinazolina.....	19
III.	Objetivos.....	21
IV.	Capítulo I.....	23
V.	Discussão.....	64
VI.	Conclusões.....	71
VII.	Perspectivas.....	73
VIII.	Referências bibliográficas.....	75

As infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) são um problema de saúde pública mundial. Apesar do incentivo para proteção e profilaxia, ainda há muitas barreiras para que se estabeleça uma linha de combate eficiente. Um dos fatores que contribui para o elevado número de casos é a falta de acesso da população de países de baixa renda a métodos rápidos e precisos de diagnóstico de algumas ISTs (HOBBS e SEÑA, 2013).

A tricomoníase é uma IST causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis*, classificada como doença de fácil cura; no entanto, pode causar graves complicações geradas pela doença, como infertilidade, problemas na gestação, predisposição ao câncer cervical e de próstata, e principalmente, aumento do risco de aquisição do HIV. Além disso, o número de casos de tricomoníase supera a soma de casos de outras ISTs, como gonorreia, sífilis e infecção por *Chlamydia* (ROWLEY et al., 2019). Como agravante dessa infecção, estudos mostram que cerca de 80% dos casos de infecção são assintomáticos em mulheres e homens (POOLE e MCCLELLAND, 2013), fato que potencializa o risco de transmissão da doença.

A única classe de medicamentos aprovada para o tratamento da infecção por *T. vaginalis* é 5-nitroimidazóis, sendo apenas dois fármacos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA/EUA), metronidazol e tinidazol. O tratamento com metronidazol ocasionalmente gera efeitos adversos, como náuseas, vômitos, diarreia, desconforto abdominal e hipersensibilidade (ALI e NOZAKI, 2007). Além disso, a resistência ao metronidazol vem se tornando muito significativa, sendo estimada em 2 a 10% dos casos de mulheres infectadas por *T. vaginalis* (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). No entanto, a tricomoníase não é uma doença de notificação compulsória e, conseqüentemente, os dados referentes às infecções por isolados resistentes também são subestimados (SECOR et al., 2014).

Além de causar agravantes na saúde, a tricomoníase e suas complicações geram um alto custo para o sistema de saúde pública. O aumento nas chances de desenvolvimento de câncer cervical e de próstata são exemplos de complicações geradas pela tricomoníase que resultam em alto custo de tratamento (SUTCLIFFE et al., 2012), além do aumento de risco de

aquisição do HIV, que geram custos de milhões de dólares nos Estados Unidos da América (EUA) (OWUSU-EDUSEI et al., 2013).

Neste contexto, pesquisas de novos agentes para o tratamento da tricomoníase são necessárias, levando em consideração seus mecanismos de sobrevivência, para a descoberta de novos alvos terapêuticos. Estudos com quinazolininas têm se mostrado promissores nas mais diversas áreas, apresentando desde atividade antiparasitária até atividade antitumoral. Deste modo, a avaliação da atividade anti-*T. vaginalis* de derivados de quinazolinina contribuirá na busca de novas alternativas para o tratamento dessa doença parasitária negligenciada.

II.Revisão do tema

II.1. *Trichomonas vaginalis*

O parasito *T. vaginalis* foi descrito pela primeira vez por Alfred Donné, em 1836, isolado da secreção vaginal de uma mulher com vaginite. A forma do protozoário varia conforme o ambiente, sendo que em condições físico-químicas favoráveis apresenta-se com formato piriforme, medindo cerca de 10 µm de comprimento e 7 µm de largura. O parasito possui cinco flagelos, sendo quatro flagelos anteriores e um incorporado à membrana ondulante. Esses flagelos conferem mobilidade ao parasito, característica importante na infecção e diagnóstico morfológico da doença (PETRIN et al., 1998). O patógeno assume uma forma ameboide quando ligado às células e forma endoflagelar (ou de pseudocisto), com os flagelos internalizados, quando em situações físico-químicas desfavoráveis (PEREIRA-NEVES et al., 2007).

Esse parasito apresenta como característica importante ser amitocondriado, tendo organelas chamadas hidrogenossomos, derivadas de mitocôndrias modificadas (LEITSCH, 2016). Os hidrogenossomos são responsáveis pela síntese de ATP e produção de hidrogênio em organismos anaeróbios (BENCHIMOL, 2009).

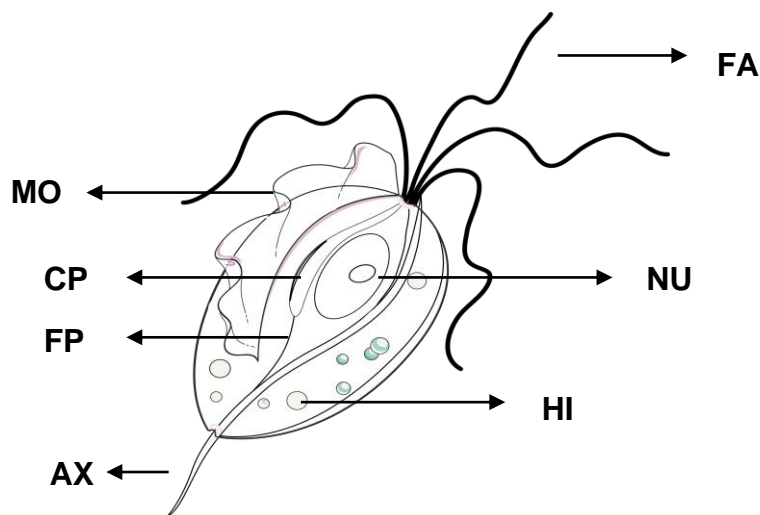


Figura 1: Características morfológicas de *Trichomonas vaginalis*. FA: flagelos anteriores, MO: membrana ondulante, NU: núcleo, CP: corpo parabasal, FP: filamento parabasal, HI: hidrogenossomo, AX: axóstilo.

II.2. Tricomoníase

II.2.1. Manifestações clínicas

A infecção causada por *T. vaginalis* pode causar inúmeras manifestações clínicas em mulheres, como corrimento purulento, irritação e prurido vulvar, dor abdominal e disúria. Um sinal característico da tricomoníase é a *colpitis macularis*, pontos hemorrágicos na mucosa vaginal ou cervical em conjunto com edema e eritema (MILLER e NYIRJESY, 2011). Nos homens pode causar uretrite, epididimite, prostatite e infertilidade (FICHOROVA, 2009). Porém, atualmente na maioria dos casos (80%) a infecção é assintomática, agravando o risco de transmissão e de cronicidade da doença (MENEZES et al., 2016).

II.2.2. Complicações

A ausência ou redução de sintomas da tricomoníase acarreta em sérias complicações, além de aumentar o risco de transmissão da doença. A demora no início do tratamento leva à cronicidade da infecção, podendo resultar em aumento do risco de desenvolvimento de câncer cervical (LAZENBY et al., 2014) e de próstata (HIRT e SHERRARD, 2015). Além disso, podem ocorrer problemas reprodutivos, como doença inflamatória pélvica, infertilidade, parto prematuro, baixo peso do recém-nascido e aumento do risco de transmissão e aquisição de HIV/AIDS (COTCH et al., 1997; SILVER et al., 2014; KISSINGER, 2015).

O risco de aquisição de HIV é potencializado pela tricomoníase por três mecanismos conhecidos: dano no epitélio hospedeiro, recrutamento de linfócitos CD4+ e macrófagos à mucosa vaginal e cervical, e secreção de cisteína peptidases que degradam o inibidor de peptidase leucocitária secretória, fator de proteção das mucosas contra patógenos e que desempenha um papel importante na prevenção da transmissão do HIV (GILBERT et al., 2000; SANCHEZ-RODRIGUEZ et al., 2007). Estudo realizado com 212 mulheres HIV-soropositivas mostrou uma taxa de coinfeção entre HIV e tricomoníase de 17,4% (SORVILLO et al., 1998). Outro estudo realizado com mulheres profissionais do sexo, que inicialmente eram HIV-soronegativas, revelou soroconversão 1,9 vezes mais em mulheres que adquiriram

tricomoníase (LAGA et al., 1993). Nos EUA os gastos relacionados a problemas de saúde decorrentes da tricomoníase chegam ao valor de 24 milhões de dólares por ano, enquanto que os custos gerados para tratamento do HIV decorrentes da tricomoníase chegam a 167 milhões de dólares por ano (OWUSU-EDUSEI et al., 2013).

II.2.3. Mecanismos de patogenicidade

O parasito *T. vaginalis* apresenta como patogenia mecanismos multifatoriais para escapar da resposta imune do hospedeiro e estabelecer a infecção. O mecanismo inicial para desenvolvimento da tricomoníase envolve as condições da microbiota vaginal. A redução da quantidade de *Lactobacillus* e a presença de microorganismos como *Candida albicans* facilita o estabelecimento do *T. vaginalis* (OZÇELIK et. al., 2012). Outro fator importante é o pH vaginal, que quando elevado, propicia a infecção (LAZENBY et. al., 2013).

A patogenia depende da aderência do parasito às células epiteliais vaginais (CEVs) através do lipofosfoglicano (TvLPG) (BASTIDA-CORCUERA et al. 2013), das adesinas (AP120, AP65, AP33, AP51 e AP23) que são reguladas por ferro (GARCIA et al., 2003), de peptidases como cisteína peptidase TvLEGU-1 (RENDON-GANDARILLA et. al., 2013) e serina peptidase TvROM-1 (MERCER e JOHNSON, 2018). Além disso, a modificação de lipídeos formando um tioéster com grupo palmitoil (NIEVASS et. al., 2018) e a presença de exossomos na superfície aumentam a citoaderência do parasito (TWU et.al., 2013). Após a aderência do parasito às CEVs, ocorre uma profunda alteração morfológica de piriforme para ameboide, facilitando o contato com as células hospedeiras (FIGUEROA-ÂNGULO et al., 2012). Concomitante ao contato, os parasitos secretam mucinases que solubilizam a mucina rompendo a barreira de muco (LEHKER e SWEENEY, 1999) e promovem a lise e fagocitose das CEVs, ocasionando dano ao epitélio (FIGUEROA-ÂNGULO et al., 2012). Em seguida, uma resposta inflamatória com liberação de interleucinas (IL-6 e IL-8) e proteína inflamatória de macrófagos (MIP-3 α) é desencadeada (FICHOROVA, 2009).

Durante a infecção, *T. vaginalis* utiliza mecanismos que driblam a resposta imune do hospedeiro, como mimetismo molecular (MERCER e JOHNSON, 2018), secreção de peptidases que degradam imunoglobulinas e a porção C3 do complemento (HERNANDEZ-GUTIERREZ et al., 2004), e variação fenotípica, que pode estar associada à presença do simbiote *T. vaginalis vírus* (TVVs) (KHOSHANAN e ALDERETE, 1994).

Embora a infecção por *T. vaginalis* possa desencadear uma resposta imune humoral, imunidade permanente não é gerada, podendo ocorrer reinfecções, e a resposta imune inata é a principal forma de combate ao estabelecimento da infecção (YADAV, 2005). Estudos mostraram que os neutrófilos são as principais células de defesa envolvidas e são capazes de matar o parasito através de trogocitose, mecanismo no qual os parasitos recebem pequenas “mordidas” que levam à morte (MERCER et. al., 2018). Além disso, o *T. vaginalis* pode apresentar simbiose com *Mycoplasma hominis*, bactéria patogênica responsável por causar infecção nos tratos urogenital e respiratório, aumentando a resposta pró-inflamatória *in vitro* de monócitos humanos (FIORI et al., 2013).

II.2.4. Tratamento

A classe de medicamentos dos 5-nitroimidazóis, metronidazol (MTZ) e tinidazol, é a única classe aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA, USA) para tratamento da infecção causada por *T. vaginalis*. O MTZ é o fármaco de escolha para tratamento da tricomoníase, porém sua utilização pode apresentar efeitos adversos, além de gerar resistência (VIEIRA et al., 2017). O tratamento é através da administração oral de dose única de 2,0 gramas de MTZ ou 0,5 gramas duas vezes ao dia por 7 dias (WORKOWSKI et al., 2015).

Alguns dos efeitos adversos que podem ser causados pela administração do MTZ são náuseas, vômitos, diarreia, desconforto abdominal, hipersensibilidade, dor de cabeça, vertigem, gosto metálico e reação ao álcool tipo dissulfiram (ALI e NOZAKI, 2007; CUDMORE et al., 2004). Também podem ocorrer reações alérgicas com desenvolvimento de urticária, erupção cutânea, prurido, broncoespasmo e febre (PEARLMAN et al., 1996).

O mecanismo de ação do MTZ ainda não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que um dos mecanismos aceitos é que o MTZ penetra no parasito por difusão passiva como pró-fármaco e é ativado nos hidrogenossomos, onde age como acceptor de elétrons formando grupamentos nitro que desestabilizam a estrutura do DNA do parasito, impedindo sua replicação e causando sua morte (DUNNE et al., 2003; KULDA, 1999). Diversas enzimas são responsáveis pela transmissão de elétrons para ativação do MTZ, como piruvato-ferredoxina-oxirredutase (PFOR), ferredoxina (Fd) e enzima málica, por exemplo (LEITSCH et al., 2009).

II.2.5. Resistência ao metronidazol

Devido ao fato da tricomoníase ser uma doença negligenciada, tanto os dados de pacientes infectados quanto os dados referentes a falhas no tratamento não são exatos, dificultando os estudos de prevalência e mecanismos de resistência. O primeiro registro de falha no tratamento do MTZ ocorreu em 1962, três anos após sua introdução como tratamento da tricomoníase (ROBINSON, 1962), dado que vai contra a ideia de resistência induzida pelo uso e a favor de que existam isolados de *T. vaginalis* naturalmente resistentes ao fármaco.

Estimativas mostram que a resistência ao MTZ chega a níveis entre 2% e 10% (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006; DUNNE et al., 2003). O mecanismo de resistência ao MTZ ainda não está completamente elucidado e isolados com resistência induzida em laboratório apresentam diferenças enzimáticas e bioquímicas em relação aos isolados clínicos resistentes. Sugere-se que a resistência anaeróbica gerada *in vitro* esteja associada com a diminuição da atividade de enzimas envolvidas na ativação do fármaco, como PFOR e Fd, e tioredoxina redutase citosólica (TrxR) (LEITSCH et al., 2009), e no número e tamanho dos hidrogenossomos (QUON et al., 1992; LAND et al., 2001). No entanto, a resistência clínica envolve a via aeróbica na qual a toxicidade do MTZ é reduzida pela re-oxidação dos ânions de radicais nitro, inativando o MTZ que volta à estrutura inicial de pró-fármaco (BRADIC et al., 2017). Recentemente, as enzimas flavinaredutase-1 (FR1) e NADH oxidase-

dependente foram relacionadas com potenciais envolvimentos no mecanismo de resistência aeróbica ao MTZ, tendo suas atividades diminuídas ou até mesmo ausentes em isolados clínicos (LEITSCH et al., 2014), resultando em acúmulo de oxigênio intracelular.

Tendo em vista as graves complicações que podem ser causadas pela tricomoníase e as dificuldades de eliminar a infecção, torna-se imprescindível a busca por compostos com atividade anti-*T. vaginalis* que apresentem novos alvos de ação para que seja possível contornar os problemas gerados pela resistência à classe de 5-nitroimidazóis.

II.3. Peptidases

Peptidases são enzimas que clivam proteínas através da quebra de ligações peptídicas. Podem ser classificadas como endopeptidases, quando a clivagem proteolítica ocorre dentro da cadeia polipeptídica, ou como exopeptidases, quando essa clivagem ocorre na terminação carboxil ou amino da proteína. *T. vaginalis* possui cerca de 440 genes codificadores de peptidases, sendo: 220 do tipo cisteína (CP), 123 metalo (MP), 80 serina (SP), 17 treonina (TP) e 6 aspártico-peptidases (AP) (ARROYO et al., 2015). As peptidases podem estar localizadas na superfície da membrana plasmática ou podem ser secretadas, em ambas situações atuando como fatores de virulência (FIGUEROA-ÂNGULO et al. 2012).

As cisteína peptidases são as mais expressas em *T. vaginalis* e podem ser classificadas em: C1 do tipo papaína e C13 do tipo leguminina. Essas peptidases são reguladas pelo ferro e estão envolvidas em mecanismos de virulência como citoaderência (TvLEGU-1), citotoxicidade (TvCP39 e TvCP65), hemólise (TvCP4), indução da apoptose de células hospedeiras (TvCP2, TvCP3, TvCP4 e TvCPT), degradação de imunoglobulinas, entre outros (PROVENZANO e ALDERETE, 1995; MIRANDA-OZUNA et al., 2019; ARROYO et al., 2015).

Metalo peptidases, como TvGP63, também estão envolvidas em fatores de virulência que atuam na citotoxicidade de células HeLa (MA et al., 2011). Uma MP imunogênica (TvMP50) foi detectada em amostra de soro de pacientes do

sexo masculino com tricomoníase. A atividade desta peptidase é dependente de Zn^{2+} , principal cátion presente no microambiente urogenital masculino sendo envolvido na patogenicidade do *T. vaginalis*. Assim, TvMP50 se mostra um possível alvo para diagnóstico de tricomoníase masculina (QUINTAS-GRANADOS et al., 2013).

Hernández-Romano et al. caracterizaram em 2010 a primeira serina peptidase semelhante a subtilisina em *T. vaginalis*, uma das maiores famílias entre as SPs. Em estudos proteômicos também foram encontradas SPs semelhantes a rombóides que são pertencentes à classe de peptidases de clivagem intramembranar (I-CLiPS), ou seja, essas SPs se localizam na membrana onde encontram e clivam seus substratos (FLUHRER, 2014). Essas peptidases romboides possuem papéis importantes como ativação da via de sinalização celular, regulação da morfologia mitocondrial (ISHIHARA et al., 2006) e fagocitose (BAXT et al., 2010). Estudo recente caracterizou duas peptidases rombóides em *T. vaginalis* (TvROM1 e TvROM3) que possuem substratos específicos e atuam na patogênese do parasito através da ligação e lise de células do hospedeiro (RIESTRA et al., 2015).

Estudos recentes têm auxiliado na identificação de classes de peptidases que possuem papéis importantes na patogênese do *T. vaginalis*. Porém, são raros os estudos com objetivo de identificar compostos que ajam através da inibição de peptidases do parasito, fato instigante tendo em vista a importância destas enzimas para a sobrevivência e patogenicidade.

II.4. Morte celular

A mitocôndria é a organela responsável por regular e promover a apoptose através da liberação de fator indutor de apoptose (FIA) e de citocromo C (ELMORE, 2007). Uma vez que a mitocôndria apresenta papel importante na morte celular, observamos que *T. vaginalis* apresenta um tipo de morte celular diferente da clássica, pois trata-se de organismo amitocondriado. Como mostrado anteriormente, esse parasito possui hidrogenossomos que estão envolvidos na produção de ATP e hidrogênio, semelhante às mitocôndrias, porém não apresenta citocromos nem enzimas da cadeia respiratória (DYALL e JOHNSON, 2000).

A literatura científica é ampla em relação às características da apoptose em organismos mitocôndriados. A apoptose é um mecanismo de morte celular programada em resposta a estímulos como dano ao DNA, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), alterações microtubulares ou defeitos mitóticos. Esse tipo de morte celular programada apresenta como características o encolhimento do citoplasma, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e formação de corpos apoptóticos (GALLUZZI et. al., 2018). Por outro lado, apoptose em *T. vaginalis* ainda não está bem descrita. Chose et al. (2002) demonstrou que o tratamento desse parasito com compostos pró-apoptóticos resultou em morte celular, apresentando condensação da cromatina, fragmentação nuclear e presença de corpos apoptóticos. Porém também foram observados vacúolos citoplasmáticos, fenômeno não característico de apoptose clássica, mas presente na morte celular classificada como paraptose. A paraptose é um tipo de morte celular programada e se distingue da apoptose clássica pelos critérios de morfologia, bioquímica e resposta a indutores de apoptose. Na paraptose, ao contrário da apoptose, não é observada fragmentação nuclear, presença de corpos apoptóticos, exposição de fosfatidilserina e há vacuolização citoplasmática (GIORDANI et al., 2011). Nesses processos de morte celular ressalta-se a importância das caspases, classe de cisteína peptidases que são essenciais para iniciar a cascata de morte celular, comuns em ambos organismos mitocôndriados e amitocôndriados, mas que ainda não foram descritas em *T. vaginalis*. Estudos sugerem a presença de caspases-like envolvidas nesses processos (CHOSE et al., 2003).

Outro tipo de morte celular descrita para *T. vaginalis* é a autofagia, processo no qual ocorre a degradação de componentes citoplasmáticos através da formação de autofagossomos que, ao se fundirem com a membrana lisossomal, tornam-se autolisossomos (vacúolos de degradação) responsáveis pela entrega do material envolvido para degradação (MEIJER e CODOGNO, 2009; HERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2019). Esse mecanismo é ativado em condições de estresse e funciona como um mecanismo de sobrevivência para eliminação de conteúdo inadequado ao funcionamento celular. O processo de autofagia é caracterizado pela formação de complexos de ubiquitina compostos por proteínas do tipo Atg que contribuem para formação do autofagossomo. O

complexo Atg8 se conjuga ao autofagossomo, podendo ser assim utilizado como um marcador deste vacúolo (OHSUMI, 2001) e é o único complexo presente em *T. vaginalis* (HERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2019). Autofagia foi sugerida como uma via compensatória para degradação de proteínas quando o sistema ubiquitina-proteossoma (UPS) estiver comprometido (NEDELSKY et al., 2008; HUANG et al., 2019), mantendo assim a homeostasia celular. Assim, pode-se sugerir que a autofagia é um mecanismo de tentativa de reverter o desencadeamento da sinalização de morte celular.

II.5. Derivados de quinazolina

A quinazolina é um heterociclo formado por dois anéis aromáticos fundidos de seis membros: benzeno e pirimidina (RAVEZ et al., 2015). Esse heterociclo tem sido utilizado como base para síntese de derivados que apresentam atividade frente à importantes patogenias.

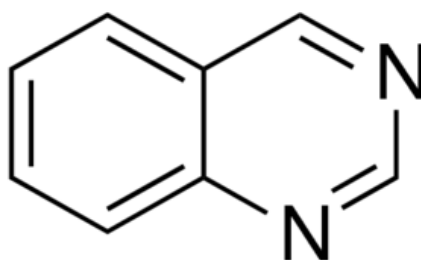


Figura 2: Estrutura básica da quinazolina.

O interesse pela quinazolina se intensificou com a descoberta da febrifugina, um de seus alcaloides, que apresenta elevada atividade antimalárica (RAVEZ et al., 2015). O FDA já aprovou alguns de seus derivados como fármacos anticâncer, como gefitinib, erlotinib e lapatinib (RAVEZ et al., 2015). Além disso, estudos *in vivo* demonstraram que derivados de quinazolina apresentam atividade para tratamento da inflamação (ABUELIZZ et al., 2017), de infecções por *Staphylococcus aureus* multirresistente (KANT et al., 2017; VAN HORN et. al., 2014) e de convulsões (ZAYED et. al., 2017). Estudos *in vitro* demonstraram atividade para tratamento da atrofia muscular espinhal

(CHERRY et. al., 2017), do citomegalovírus humano (FROELICH et. al., 2017), de diversos tipos de câncer (ZENG et al., 2017; BARBOSA et. al., 2014; FROLICH et. al., 2017), de tuberculose (TANG et al., 2017), e de Alzheimer (LI et al., 2012).

A atividade de derivados de quinazolina também vem sendo investigada na área parasitológica, apresentando resultados promissores. Em relação às leishmanioses, os resultados mostram potente atividade frente a *Leishmania donovani*, *Leishmania amazonensis* (VAN HORN et al., 2014) e *Leishmania mexicana* (MENDOZA-MARTÍNEZ et al., 2015). Os derivados de quinazolina também apresentaram atividade contra *Trypanosoma cruzi*, sendo os compostos mais ativos que os medicamentos de referência utilizados para doença de Chagas (MENDOZA-MARTÍNEZ et al., 2015).

Em relação a protozoários parasitas, os estudos de atividade antimalárica de compostos derivados de quinazolina ganham destaque. Estudos *in vivo* mostraram potente atividade frente a *Plasmodium berghei*, onde os compostos testados apresentaram efeito semelhante aos controles positivos utilizados e não houve efeitos adversos em camundongos (MENDOZA-MARTÍNEZ et al., 2015). Atividade frente a cepas sensíveis e resistentes de *Plasmodium falciparum* também foi demonstrada (GELLIS et al., 2016; KABRI et al., 2010; FROELICH et. al., 2017).

Derivados de quinazolina vêm se mostrando potentes candidatos para utilização no tratamento de diversas patologias. Considerando os dados relatados de estudos previamente desenvolvidos para compostos dessa classe e na crescente necessidade de desenvolvimento e síntese de novas moléculas que supram a carência de fármacos para o tratamento da tricomoníase, estes compostos surgem como potenciais candidatos a agentes tricomonocidas.

III.Objetivos

III.1. Objetivo geral

O objetivo geral do estudo foi avaliar e caracterizar a atividade *in vitro* anti-*T. vaginalis* de derivados de 2,4-diamino-quinazolina visando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tratamento da tricomoníase.

III.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* de seis compostos derivados de 2,4-diamino-quinazolina: **PH100, PH101, PH110, PH111, PH114 e PH117**.
2. Avaliar o efeito dos compostos na proliferação de isolados clínicos frescos e provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC).
3. Investigar a citotoxicidade dos compostos frente às linhagens celulares de fibroblasto, células epiteliais vaginais e renais, e eritrócitos humanos.
4. Testar a associação do derivado mais ativo com metronidazol.
5. Investigar o mecanismo de ação através do estudo do envolvimento de peptidases no mecanismo de morte do parasito.
6. Investigar o tipo de morte celular associado ao mecanismo de ação do derivado mais ativo.

2,4-diamine-quinazoline derivative kills *Trichomonas vaginalis* by peptidases modulation and apoptosis-like cell death

Juliana Inês Weber^a, Graziela Vargas Rigo^a, Débora Assumpção Rocha^b, Isadora Serraglio Fortes^b, Saulo Fernandes de Andrade^b, Tiana Tasca^{a*}

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, anti-*T. vaginalis* activity, quinazoline, , apoptosis, peptidases.

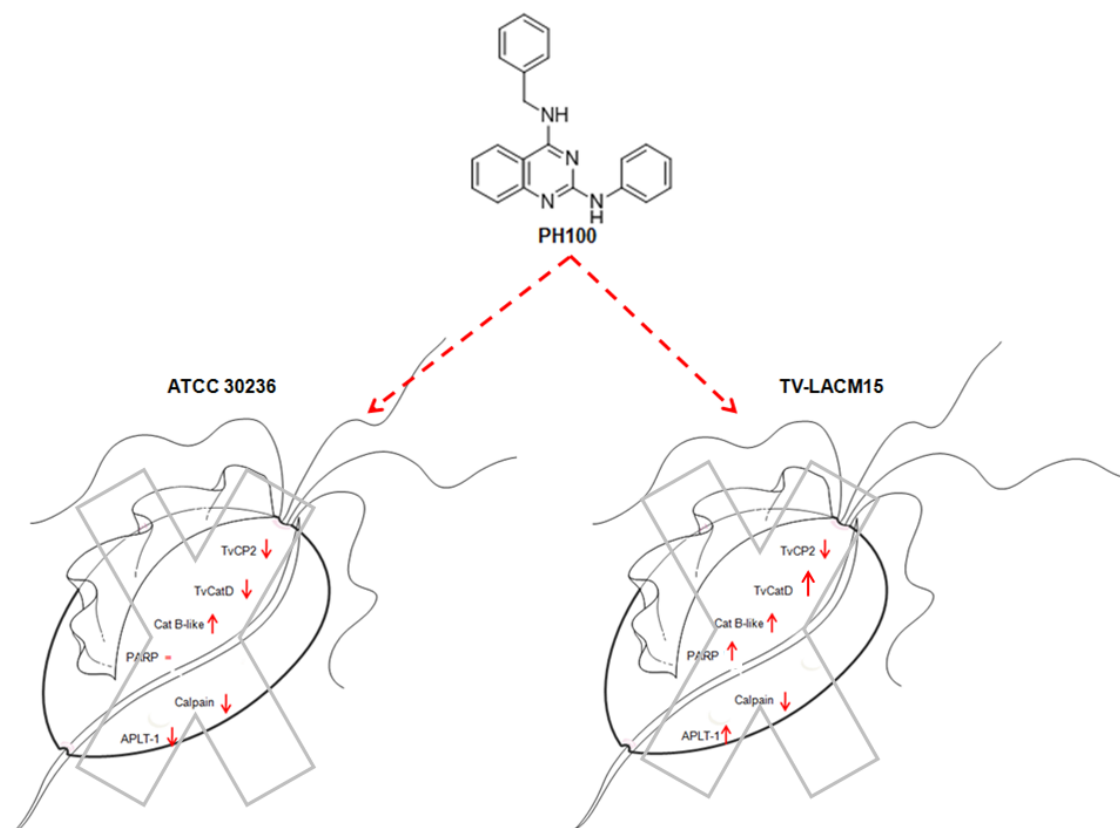
Short running title: Quinazoline against *T. vaginalis*

^a Research Group on Trichomonas, Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bPharmaceutical Synthesis Group (PHARSG), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author: at Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.tiana.tasca@ufrgs.br

Graphical abstract



Abstract

Trichomonas vaginalis is the agent of human trichomoniasis, the most prevalent non-viral sexually transmitted infection (STI) in the world. This infection is classified as a neglected disease and compulsory notification is not required, leading to underestimated prevalence, which makes it a serious public health issue. Considering the complications due to trichomoniasis and the failures in the treatment, it is crucial to search for new therapeutic alternatives. In this study the anti-*T. vaginalis* activity of 2,4-diamine-quinazoline derivative compound (**PH100**) was evaluated. **PH100** showed good activities against fresh clinical isolates (mainly TV-LACM15, with IC_{50} = 14.8 μ M) and *American Type Culture Collection* isolates (ATCC 30236, with IC_{50} = 50 μ M) and good selectivity indexes against tumor lineage cells (HMOVII) or not (3T3-C1 and VERO) and erythrocytes. In addition, **PH100** showed synergistic action with metronidazole, indicating that these compounds act by different mechanisms. When investigating the mechanism of action of **PH100** to ATCC 30236, apoptosis-like characteristics were observed, such as phosphatidylserine exposure seen by the Annexin-V assay, membrane changes by scanning electron microscopy, and modulation of gene expression of enzymes described as related to apoptosis in other organisms. The same findings were not observed for TV-LACM15 isolate treated with **PH100** revealing a distinct profile between *T. vaginalis* isolates. Furthermore, **PH100** seems to modulate peptidase activity in both isolates, a fact that should be further investigated.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, anti-*T.vaginalis*, quinazoline, apoptosis-like, peptidases

1. Introduction

The sexually transmitted infections (STIs) are a public health problem. Despite the incentive for protection, there are still many barriers for an efficient fighting line to be established. One of the contributing factors for the high number of cases is the lack of access to quick and accurate diagnosis of some STIs by the population of low-income countries (Hobbs and Seña, 2013). Trichomoniasis is not a disease of compulsory notifying (Poole and McClelland, 2013) which contributes for an underestimated number of cases.

In 2016 the numbers of new cases among adults, between 15 and 49 years old, infected by sexually transmitted infections – among them: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, syphilis and *T. vaginalis* – reached around 376.4 million, being *T. vaginalis* responsible for 156 million of cases and for the most prevalent non-viral STI in the world (Rowley et al., 2019). Studies show that 80% of cases of trichomoniasis are asymptomatic in women and men (Poole and McClelland, 2013), a fact that potentiates the disease risk of transmission. Beyond the problems derived from trichomoniasis, the infection is associated with the potential risk of acquiring other sexually transmitted pathogens, such as HIV (Kissinger, 2015). *T. vaginalis* infection shows as main complications the increased risk of cervical and aggressive prostate cancers development (Hirt and Sherrard, 2015) and problems during pregnancy (Menezes et al., 2016).

The only class of drugs approved for the treatment of *T. vaginalis* infections is 5-nitroimidazoles, with metronidazole as first choice and tinidazole. However, there is a report of estimates of up to 10% of individuals being non-responsive to treatment and the resistance to metronidazole is estimated in 2-10% of cases (Schwebke and Barrientes, 2006). The mechanism of action of metronidazole is not completely elucidated, but the most acceptable mechanism is based on formation of a nitro-radical anion, through the transferring of an electron to the nitro group, which is toxic to the parasite. Treatment with metronidazole occasionally causes side effects such as nausea, vomiting, diarrhea, abdominal discomfort and hypersensitivity (Ali and Nozaki, 2007).

Besides that, the resistance to metronidazole estimated in 2-10% of cases has become significant (Schwebke and Barrientes, 2006). Therefore, research

on new agents with new therapeutic targets for the treatment of trichomoniasis is required.

Quinazoline is composed by two aromatic rings fused by six members, benzene and pyrimidine (Ravez et al., 2015). The interest for the quinazoline has been intensified by discovery of febrifugine, which presents antimalarial activity (Ravez et al., 2015). The FDA (Food and Drug Administration) has approved many derivatives as anticancer drugs, such as the gefitinib, erlotinib, and lapatinib (Ravez et al., 2015). Moreover, studies have already shown that derivatives of quinazoline present pharmacological activities: anti-inflammatory (Abuelizz et al., 2017), anticancer (Zeng et al., 2017), against multi-resistant *Staphylococcus aureus* (Kant et al., 2017), anti-*Leishmania* (Martínez et al., 2015), anti-*Trypanosoma* (Martínez et al., 2015), anti-malaric (Gellis et al., 2016), for Alzheimer treatment (Li et al., 2012), antimicrobial (Tang et al., 2017) anti-hyperglycemic (Ibrahim et al., 2017) anticonvulsant, antidepressant (Amir et al., 2013) and anti-hypertensive (Pathak et al., 2014).

Based on previous studies that reveal the potential of quinazoline and on the need for the development and synthesis of new molecules that meet the lack of drugs for treatment of trichomoniasis, this study aimed to evaluate the anti-*T. vaginalis* activity of 2,4-diamine-quinazoline derivative and to characterize the mechanism of action.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 2,4-diamine-quinazoline derivatives synthesis

The compound were synthesized as previously described with some modifications (Barbosa et al., 2014) starting from dichloroquinazoline substitutions and obtaining the desired 2,4-diamine-quinazoline derivative (**PH100**). (Fig. 1).

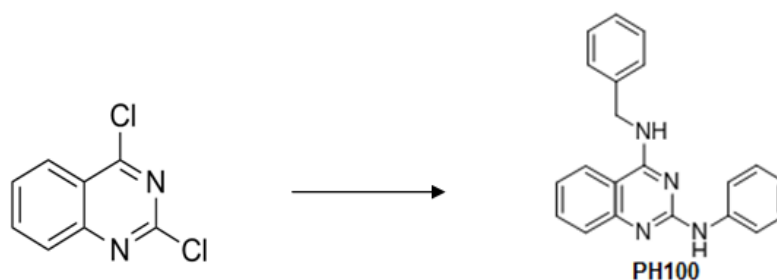


Fig. 1: Chemical structure of dichloroquinazoline and tested compound.

2.2. Culture of *T. vaginalis*

The assays used *T. vaginalis* ATCC30236 isolate and three fresh clinical isolates (TV-LACH4, TV-LACM15 and TV-LACM22). The clinical isolates were selected according: harbouring TVV (*Trichomonas virus*) only (TV-LACH4), *Mycoplasma hominis* only (TV-LACM22) or not harbouring TVV neither *M.hominis* (TV-LACM15). Trophozoites were cultured *in vitro* at 37°C in trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium, supplemented with 10% (v/v) heat inactivated bovine serum (Diamond, 1957). Parasites in the logarithmic phase of growth were centrifuged and resuspended on new TYM medium for anti-*T. vaginalis* assays.

2.3. Minimum inhibitory concentration (MIC) and IC₅₀ determination

The MIC, which is the minimum concentration able to kill 100% of parasites, and the IC₅₀ value, the concentration needed to kill 50% of parasites, were determined on 96-well microtiter plates, where different volumes of TYM medium were added to each well. Thereafter, **PH100** at eight-fold serial dilution from 100 µM and 1.0×10^5 trophozoites/mL were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24 h. Two controls were prepared: trophozoites with no treatment and the vehicle control (0.6% dimethyl sulfoxide - DMSO). After incubation, the parasites were counted using hemocytometer and analyzed for their motility and morphology by trypan blue exclusion dye (0.2%, v/v). The wells corresponding to MIC values and concentrations below and above, as well as controls were

inoculated in fresh TYM medium at 37°C. The parasites were analyzed every 24 h for 120 h to confirm MIC. The results were expressed as the percentage of viable trophozoites compared to negative control.

2.4. *In vitro* cytotoxicity

The non-tumor murine fibroblast lineage, 3T3-C1, a non-tumour lineage from kidney epithelium, VERO, and a tumor lineage from human vaginal epithelium, HMVII, were used. 3T3-C1 and VERO were cultured in DMEM medium and HMVII in RPMI medium both supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and incubated at 37°C, 5% CO₂. For the test, 1.0×10⁴ cells/well were seeded in 96-well microtiter plates for 24 h. After, the medium was replaced with fresh medium containing **PH100** at serial dilutions from 100 µM. Three controls were prepared: control with cells only, vehicle control and positive control (Triton X-100 0.2%). The plates were incubated for 48 h. After this time, a solution of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (0.5 mg/mL) was added and incubated for one hour at 37 °C. MTT was removed and the insoluble purple formazan was dissolved in DMSO. The amount of reduced MTT was measured at 570 nm (Hübner et al., 2016).

2.5. *In vitro* hemolytic assay

Erythrocytes were obtained from the heparinized blood of healthy human donors. The UFRGS Research Ethical Committee approved documents, procedures, and project under authorization CAAE 47423415.5.0000.5347. Erythrocytes suspension (5 × 10⁷ cells/mL) was incubated with **PH100** at decreasing concentrations from 100 µM, for 24 h at 37 °C (Kiss et al., 2010). Three controls were prepared: control with erythrocytes only, vehicle control and positive control (Triton X-100 0.2%). Hemoglobin released into the supernatants was quantified spectrophotometrically at 540 nm.

2.6. Effect of PH100 compound in *T. vaginalis* kinetic growth assay

The *T. vaginalis* ATCC 30236 and the fresh clinical isolate TV-LACM15 were treated or not with **PH100** at a density of 1.0×10^5 trophozoites/mL (including vehicle control and control with parasites only) at the MIC and IC₅₀ values and incubated in TYM medium. The counting of viable trophozoites with hemocytometer was performed at 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 and 120h. The results were expressed as trophozoites/mL by comparing treated viable trophozoites with untreated parasites.

2.7. Checkerboard assay

The *T. vaginalis* TV-LACM15 isolate was used to check metronidazole and **PH100** interaction at concentrations: $4 \times \text{IC}_{50}$, $2 \times \text{IC}_{50}$, IC_{50} , $\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50}$, $\frac{1}{4} \times \text{IC}_{50}$. Two controls were prepared: control containing trophozoites with no treatment and vehicle control (DMSO 0.6%). Fractional inhibitory concentration index (FICI) was estimated using the following formula: $\text{FICA} + \text{FICB} = \text{FICI}$, where FICA is the value of **PH100** in the combination/value of **PH100** alone, and FICB is the value of metronidazole in the combination/value of metronidazole alone. The interaction was classified as 'synergy' if $\text{FICI} \leq 0.5$, 'antagonism' if $\text{FICI} > 4.0$ and 'no interaction' if $\text{FICI} = 0.5 - 4.0$ (Odds et al., 2003).

2.8. Quantification of reactive oxygen species (ROS) production by trichomonads

Some modifications were carried out to adjust the experiment, previously described (Mallo et al., 2013). Trophozoites of ATCC 30236 and TV-LACM15 isolates were washed with phosphate buffered saline 1x (PBS pH 7.0; 37°C), resuspended at 5.0×10^6 trophozoites/mL density and incubated for 1 h at 37 °C with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (2',7'-DCF-DA) in a final concentration of 10 µM. After, **PH100** was added at the IC₅₀ values and incubated for additional 1 h. Two controls were prepared: trophozoites with no treatment and positive control (parasites treated with 5 mM of hydrogen peroxide). In order to evaluate the ROS production, fluorescence was measured by flow cytometry

(FACSVerse, Becton Dickinson, CA) and 10,000 cells were gated and analyzed using FACSuite™ software (Becton Dickinson).

2.9. Annexin V-FITC assay

Trophozoites (ATCC 30236 and TV-LACM15 isolates) were treated with **PH100** at the IC_{50} for 24 h, were washed with PBS 1× (pH 7.0; 37°C), resuspended in binding buffer, resulting in a concentration of 1.0×10^6 trophozoites/mL. Then, 100 μ L of parasite suspension, 5 μ L of Annexin V-FITC, and 5 μ L of propidium iodide (PI) were added to the incubation media at 25°C for 15 min (protected from light) and after, 100 μ L of binding buffer added. Apoptosis was measured by flow cytometry (FACSVerse, Becton Dickinson, CA) and 10,000 trophozoites were gated and analyzed using FACSuite™ software (Becton Dickinson).

2.10. Determination of autophagy by acridine orange

Acridine orange solution was used to label the cytoplasm and cell nuclei with green fluorescence and when is an acid environment emit red fluorescence because physico-chemical modifications. Thus, green cells and with high red fluorescence are characterized as cells performing autophagy. Trophozoites (ATCC 30236 and TV-LACM15 isolates) that were treated with **PH100** at the IC_{50} for 24 h, were washed and resuspended with DMEM. 100 μ L of 1.0×10^6 trophozoites with 1.0 μ g/mL of acridine orange were incubated at 25 °C for 15 min. Autophagy was measured by flow cytometry (FACSVerse, Becton Dickinson, CA) and 10,000 trophozoites were gated and analyzed using FACSuite™ software (Becton Dickinson).

2.11. Effect of PH100 on gene expression of *T. vaginalis* enzymes

In order to investigate the involvement of enzymes related to apoptosis in the mechanism of action of **PH100**, the gene expression of six enzymes were analyzed by qRT-PCR. The ATCC 30236 isolate and the fresh clinical isolate TV-LACM15 were incubated for 24 h with **PH100** at IC_{50} values. After incubation,

total mRNA was extracted with TriZol™, the purity and quantity were measured on the Thermo Scientific NanoDrop 1000® spectrophotometer and only high-quality samples were used on the analysis. Standard curve primers were performed using cDNA in 0.1 mL strip tubes using GoTaq® 1-step RT-qPCR system. For analyzes, reaction tubes contained a final volume of 12 µL: 5 µL 2x GoTaq® qPCR Master Mix, 0.2 µL GoScript™ RT Mix, 0.1 or 0.2 µM primer and 2 µL RNA. ID genes were obtained in previous apoptosis studies with other cell lines. The search of homolog enzymes in *T. vaginalis* were obtained on TrichDB (<https://trichdb.org/trichdb/>) and sequences were chosen considering lower similarity with human genes. These sequences were used to design primers in Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) and aligned against the *T. vaginalis* genome to verify their specificity (Table 1). Quantitative reverse transcriptions were performed using 5 ng of RNA and cycling conditions were enzyme activation at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles: 95°C for 10 s; 60°C or 64°C for 40 s with fluorescence collection and the final step of 72°C for 40 s. Melting curve was performed by increasing temperature from 60 °C, 64 °C and 68 °C to 95 °C with 1 °C for 5 s. DNA topoisomerase II (*DNAtopII*) was used as normalizing gene and reactions were performed as previously described (Santos et al., 2015). Negative control with no mRNA was used. Rotor-Gene Q series software 2.1.0 were used to analyze of mRNA relative expression of genes. DNA topoisomerase II gene value (ΔCt) was used for threshold cycles (Ct) and sample was compared to control ($\Delta\Delta Ct$). Fold change values were expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Table 1: Parameters used in qRT-PCR: Enzyme, gene name, ID, primers sequence, primers concentrations; annealing temperature (Ta) and reference.

Enzyme	Name	ID	Primers sequences (5' to 3')	Primers concentrations (µM)	Ta (C°)	Reference
Poly [ADP-Ribose] Polymerase	PARP	TVAG_174840	F: CAG CAG CCA CAA AAG ACA AA	0.2	64	Jarrar et. al., 2018
			R: ATC GCA CGT TCA CCA ATA GC			
Cathepsin D-like	TvCatD	TVAG_336300	F: TAC AAC CCA GAT GCT TTC TC	0.2	64	Dubey and Luqman, 2017
			R: GCA TAG ATG TGC CTG TAT CA			
Cathepsin B-like	CatB-like	TVAG_488380	F: CAA GAG TGC GGT TGT TGC TA	0.2	60	Cavallo-Medved et.al., 2011
			R: TAA GCG CAT GCT GTT CAA GA			
Cathepsin L-like	TvCP2	TVAG_057000	F: CTG AAC TCG CTA AGG CTG CT	0.1	68	Shen et. al., 2019
			R: GTT GCG GAC GAT CCA GTA GT			
Calpain-like	Calpain-like	TVAG_161170	F: CCA AAG GAT GCA CGA ATT TT	0.2	60	Sato and Kawashima, 2001
			R: GCG GAC ATT AGC TGG TTT GT			
Aminophospholipid translocase	APLT-1	AF145277.1	F: TTC GCT TCT GAA TGC AAC TG	0.2	64	Das et. al., 2003
			R: AGA CCT TCT TCG CCC TGT TT			

NA: nonassigned name

2.12. Scanning electron microscopy (SEM)

Trophozoites (ATCC 30236) were treated or not with **PH100** at IC₅₀ for 24 h, washed with PBS 1x and fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde for 2 h 30 min. Then, trophozoites were washed with sodium cacodylate buffer (0.1 M pH 7.2) and post-fixed in 1% (v/v) osmium tetroxide for 2 h. The samples were added on a circular cover slip and dehydrated in acetone gradient (30, 50, 70, 80, 95 and 100° GL). Critical point dried was carried out with CO₂ and coated with gold particles. Samples were observed in JEOL JSM 6060 scanning electron microscope.

2.13. Peptidases activity by azocasein assay

Azocasein degradation was used to verify involvement of peptidases activity on **PH100** mechanism of action. Protein levels were measured using the Coomassie blue method (Bradford, 1976) and a final concentration of 0.8

mg/mL was used to assure linearity in 0.1 M Tris-HCl pH 7.0. The assay was carried out for 90 min at 37 °C with 2% azocasein (Sigma-Aldrich, Co.) as substrate. The reaction was interrupted with cold 10% trichloroacetic acid. The samples were centrifuged at 10,000×g for 5 min and 1.8 N NaOH was added to supernants. Absorbance was measured at 420 nm. Percentage of azocasein degradation was compared with the control as not-treated parasites showing 100% of peptidase activity and trophozoites treated with **PH100** at IC₅₀.

2.14. Peptidases zymograms

Peptidase activities were analyzed using SDS-PAGE on 12.5% polyacrilamide gel co-polymerized with 1.0% gelatin. After 24 h of incubation with **PH100** at IC₅₀ (ATCC 30236 and TV-LACM15) trichomonads were washed with 0.8% saline. Total protein levels were measured using the Comassie blue method (Bradford, 1976) and the final concentrations were adjusted with sample buffer (H₂O, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, glycerol, 10% SDS and bromophenol) to 60 µg/mL protein. After electrophoresis, peptidases were renatured with 2.5% Triton X-100 for 1 h and activated with 50 mM phosphate buffer pH 5.5 for 24 h at 37 °C. Gel was washed with water and stained with Comassie brilliant blue for 2 h to determine proteolytic activity that was detected as white bands against a blue background after destaining with 40% methanol in 10% acetic acid. Both *T. vaginalis* isolates with no treatment were used as negative controls. In addition, SDS-PAGE on 12.5% polyacrilamide gel was carried out without gelatin to approximately determinate the molecular weight of protein bands.

2.15. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and with at least three independent cultures (n=3). Data were expressed by mean ± standard deviation (S.D.). Statistical analysis was conducted using the Student's *t* test and a 5% level of significance was applied to the data. The GraphPad Prism software (San Diego, CA) was used for IC₅₀ and CC₅₀ determination by non-linear

regression. The selectivity index (SI) for each mammalian cell was calculated based on the ratio CC_{50}/IC_{50} .

3. RESULTS

3.1. PH100 showed anti-*T. vaginalis* activity, low cytotoxicity and no hemolytic effect

The compound was tested against fresh clinical isolates (TV-LACM15, TV-LACM22, and TV-LACH4) and ATCC 30236 (Table 2) and revealed the major active against the fresh clinical isolate TV-LACM15. The **PH100** showed low values of HC_{50} and high SI against erythrocytes, indicating that compound was not hemolytic and low cytotoxicity for trichomonads with selectivity index higher than 1.0.

Table 2: Anti-*Trichomonas vaginalis* activity and cytotoxicity effect of **PH100** and metronidazole..

Compound	ATCC 30236		TV LACM15		TV LACM22	TV LACH4	VERO		HMVII		3T3-C1		Hemolysis	
	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	CC ₅₀	SI	CC ₅₀	SI	CC ₅₀	SI	CC ₅₀	SI
PH 100	90.0 µM	50.0 µM	80.0 µM	14.8 µM	22.0 µM	27.0 µM	32.0 µM	2.2	14.0 µM	1.0	35.0 µM	2.4	> 100 µM	>10
Metronidazole	1.14 µM	0.4 µM	25.0 µM	1.1 µM	6.4 µM	2.7 µM	> 100 µM	> 10	> 100 µM	> 10	> 100 µM	> 10	> 100 µM	> 10

3.2. PH100 abolished *T. vaginalis* growth

To analyze the influence of **PH100** on *T. vaginalis* proliferation, kinetic growth experiments using ATCC 30236 and TV-LACM15 isolates were performed. An initial inoculum of 1×10^5 trophozoites/mL was incubated in the presence of **PH100** at MIC and IC₅₀ values and the results show the curve of viable trichomonads. The effect of **PH100** at IC₅₀ concentration caused a delay on trophozoites proliferation, as expected due to lower **PH100** concentration, and organisms recovered growth after 48 h (Fig. 3A and C). Conversely, when tested at MIC, **PH100** totally inhibited the parasite growth of both isolates after 6 h of incubation (Fig. 3B and D).

3.3. Checkerboard

The checkerboard assay showed a synergistic effect (FICI ≤ 0.5) upon association of **PH100** and metronidazole using TV-LACM15 isolate. This fresh clinical isolate presented lower metronidazole susceptibility when compared with ATCC 30236 (Fig. 4).

		PH100 concentration (μM)				
		3.70	7.40	14.8	29.6	59.2
MTZ concentration (μM)	0.26	2.61	3.23	2.55	2.57	1.01
	0.52	2.68	2.35	2.38	2.43	0.79
	1.06	2.53	1.99	1.96	0.96	0.61
	2.11	1.88	1.14	0.91	0.68	0.51
	4.22	1.30	0.96	0.49*	0.38*	0.01*

Fig. 4: FICI data for *T. vaginalis* TV-LACM15 isolate for each combination tested of **PH100** and metronidazole. *Statistically significant with at least $p < 0.05$ compared to control (untreated trophozoites).

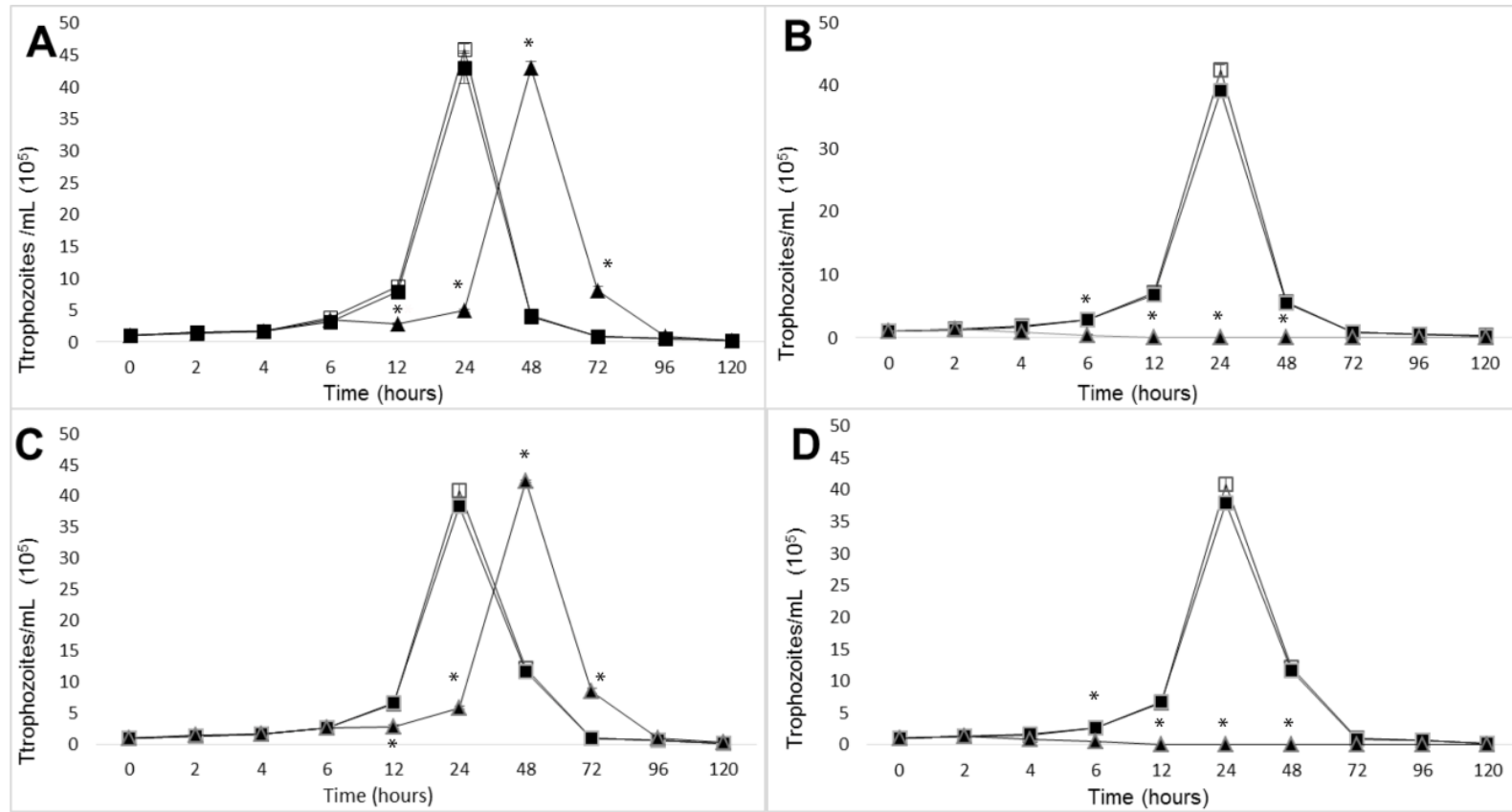


Fig.3: Growth kinetics of **PH100**-treated trophozoites: **A)** ATCC30236 isolate at IC₅₀ (50 μM); **B)** ATCC30236 isolate on MIC (90 μM); **C)** TV-LACM15 clinical isolate on IC₅₀ (14.8 μM); **D)** TV-LACM15 clinical isolate on MIC (80 μM). Legend: □ Untreated control, ▪ Vehicle control, ▲ **PH100**-treated trophozoites. (*) Statistically significant difference (p<0.05) when compared to the negative control by the Student's *t* test.

3.4. PH100 did not affect ROS production by *T. vaginalis*

Addition of **PH100** at IC₅₀ did not significantly affect intracellular ROS production when compared to hydrogen peroxide (positive control) (Fig. S1).

3.5. PH100 induced apoptosis-like cell death

PH100 induced phosphatidylserine exposition in ATCC 30236 trophozoites suggesting an apoptosis-like cell death, revealing fluorescent units in characteristic regions. On the other hand, and very intriguing, **PH100** did not induce cytoplasmatic translocation of phosphatidylserine after annexin V assay in TV-LACM15 trophozoites, differing from the ATCC isolate (Fig. 5). Table 3 demonstrated increase in granularity (FSC) and cell internal complexity (SSC) as amount and type of cytoplasmic granules and membrane roughness, suggesting morphological changes in ATCC 30236 trophozoites.

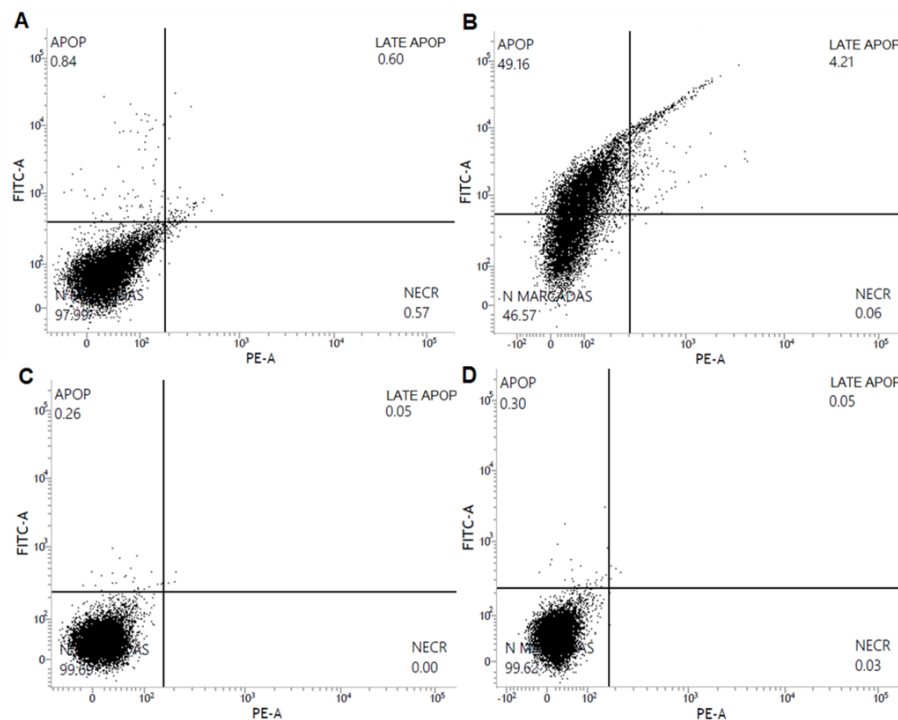


Fig. 5: Effect of **PH100** on *T. vaginalis* suggesting apoptosis-like cell death. **A)** ATCC30236 isolate without treatment; **B)** ATCC 30236 isolate treated with **PH100** at IC₅₀ (50 μM); **C)** TV-LACM15 clinical fresh isolate without treatment; **D)** TV-LACM15 clinical fresh isolate treated with **PH100** at IC₅₀ (14.8 μM). Data are representative of four different experiments (n=4).

Table 3: Comparison of cell death events including apoptosis, late apoptosis, necrosis, normal morphology, and granularity (FSC and SSC) by flow cytometry analysis of *T. vaginalis* treated or not with **PH100**.

	ATCC 30236 Control	ATCC 30236 PH100	TV-LACM15 Control	TV-LACM15 PH100
Normal Morphology (%)	96.50 ± 2.58	45.91 ± 1.77	99.45 ± 0,25	99.45 ± 0.25
Apoptosis (%)	2.19 ± 1.69	40.80 ± 7.70 *	0.39 ± 0.16	0.38 ± 0.12
Late Apoptosis (%)	0.98 ± 0.82	12.16 ± 6.88	0.10 ± 0.04	0.06 ± 0.02
Necrosis (%)	0.32 ± 0.17	1.14 ± 1.05	0.03 ± 0,06	0.05 ± 0.04
FSC^A	32.60 ± 1.48	86.26 ± 9.7 *	28.67 ± 2.37	36.34 ± 1.25
SSC^A	65.90 ± 2.3	89.90 ± 7.00 *	58.94 ± 1.23	64.68 ± 0.87

^AForward-angle light scatter (FSC) and side scatter (SSC) means of trophozoites treated and or not with **PH100** at IC₅₀. *Statistically significant with at least $p < 0.05$ compared to control (untreated trophozoites).

3.6. PH100 did not induce autophagy on *T. vaginalis*

No emission of red fluorescence on the flow cytometry was observed in both ATCC 30236 and TV-LACM15 isolates treated with **PH100** at IC₅₀ in 24 h in comparison to their respective controls with no treatment (Fig. S2). This finding indicates that **PH100** did not induce autophagy in *T. vaginalis*.

3.7. PH100 modulated gene expression of apoptosis-like enzymes

The quantification of gene expression of enzymes related to apoptosis was compared to the normalizing gene of DNA topoisomerase II. When ATCC 30236 and TV-LACM15 trophozoites were treated with **PH100** it was observed no significant change in the gene expression of PARP for ATCC 30236, but was a significant increase for TV-LACM15 isolate. The gene expression of cathepsin D-like (TvCatD) decreased in ATCC 30236 and increased in TV-LACM15 isolates. On the other hand, cathepsin B-like was increased, cathepsin L-like (TvCP2) and calpain-like were decreased for both isolates. Interestingly, the gene expression of aminophospholipid translocase (APLT-1), an enzyme

directly associated to apoptosis, was different for isolates, with a significant decrease for ATCC 30236 and increase for TV-LACM15 (Fig. 6). These results indicate that the treatment with **PH100** modulates the enzymes gene expression related to apoptosis-like cell death in *T. vaginalis* and reveal distinguished profiles between isolates.

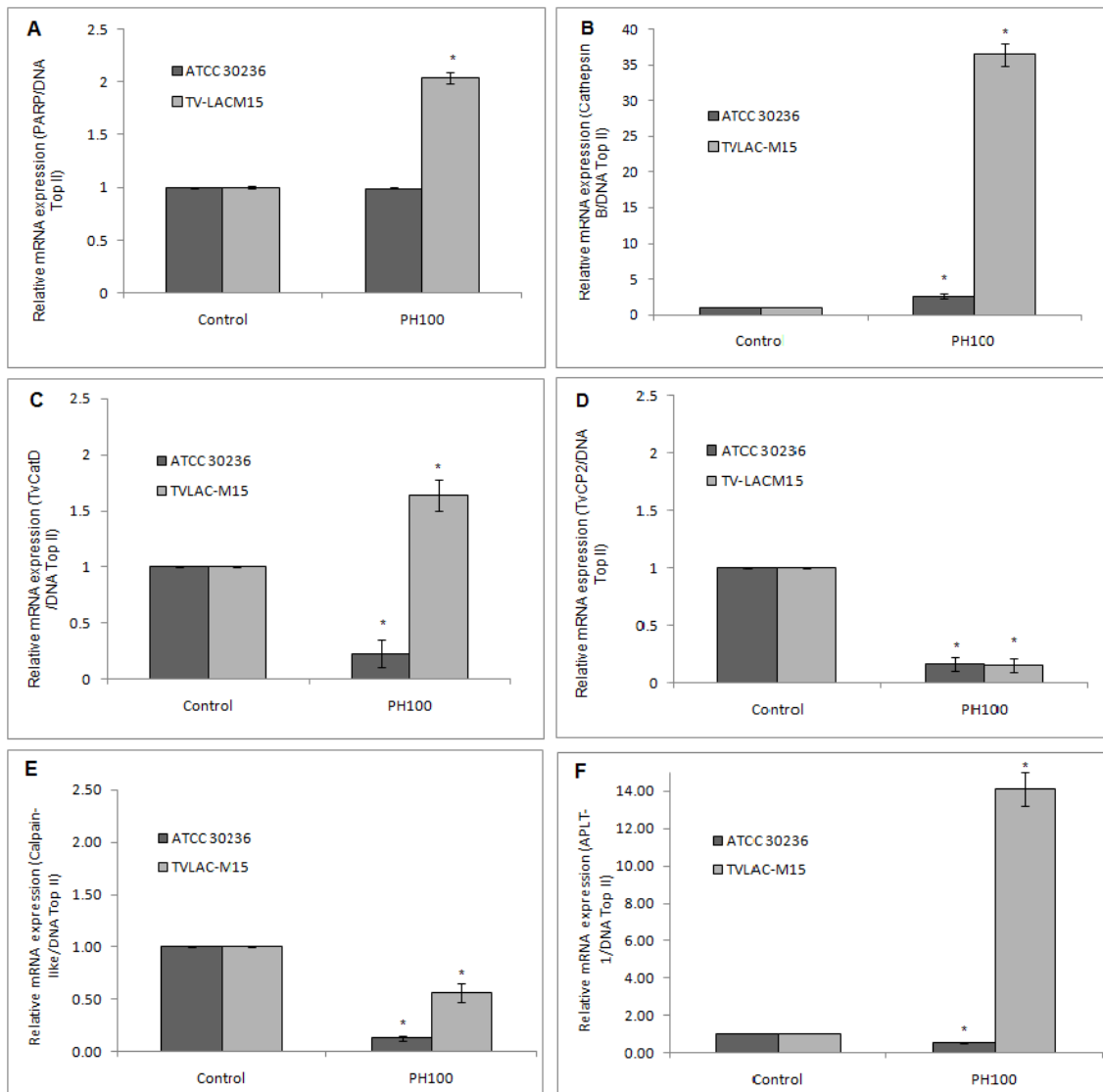


Fig.6: Gene expression of *T. vaginalis* enzymes possibly involved in apoptosis-like cell death. The ATCC 30236 and TV-LACM15 isolates were treated or not with PH100 at IC50 (50 μ M and 14.8 μ M, respectively). **A)** PARP; **B)** Cathepsin B-like; **C)** TvCatD; **D)** TvCP2; **E)** Calpain-like; **F)** APLT-1. (*) Statistically significant difference (p<0.05) when compared to the negative control by the Student's *t* test.

3.8. Scanning electron microscopy (SEM)

The *T. vaginalis* ATCC 30236 isolate morphology was evaluated after incubation with **PH100** at IC₅₀ (50 µM) for 24 h and compared to untreated parasites. As shown in Fig. 6, untreated parasites presented normal pyriform shape with characteristic features, undulating membrane (UM), free anterior flagella (AF), and axostyle (AX) (Fig. 7A). In contrast, **PH100** treated parasites revealed alterations in the shape evidenced by the rounded form and internalization of flagella (Fig. 7B-D) revealing endoflagellar or pseudocyst forms (Fig. 7E), commonly found under stressful conditions.

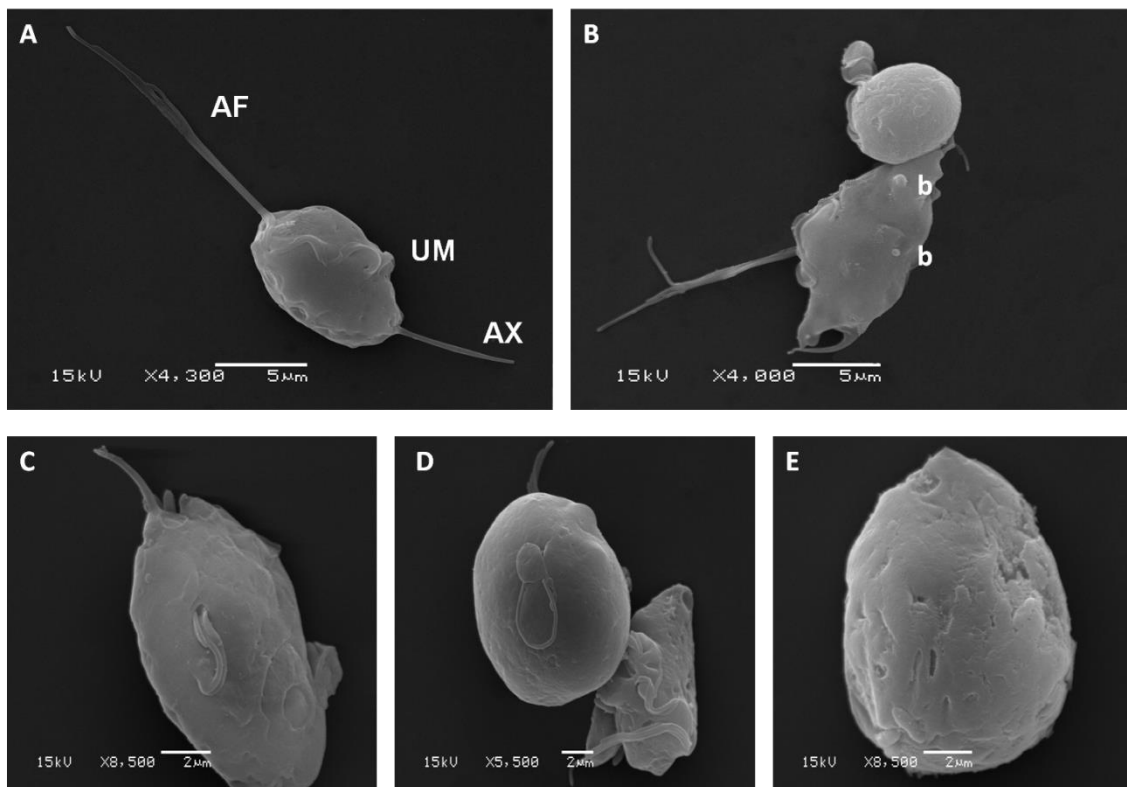


Fig. 7: SEM of ATCC 30236 *T. vaginalis* isolate treated or not with **PH100**. **A)** *T. vaginalis* with no treatment presented normal morphology: (AF) four anterior flagella, (UM) undulating membrane and (AX) axostyle. **B-E)** *T. vaginalis* after treatment with **PH100** at IC₅₀ (50 µM) for 24h. **B)** An endoflagellar or pseudocyst form and a trophozoites howing blebbing (represented with b) or protrusions of the membrane; **C and D)** Trophozoites initiating the internalization of flagella and alteration of the pyriform to the endoflagellar shape; **E)** a characteristic endoflagellar form or pseudocyst, with all flagella internalized

3.9. Azocasein assay

Azocasein assay showed that ATCC 30236 and TV-LACM15 trophozoites treatment with **PH100** at IC₅₀ (50 and 14.8 μM, respectively) decreased peptidases activity (60%) when compared with control (Fig. 8).

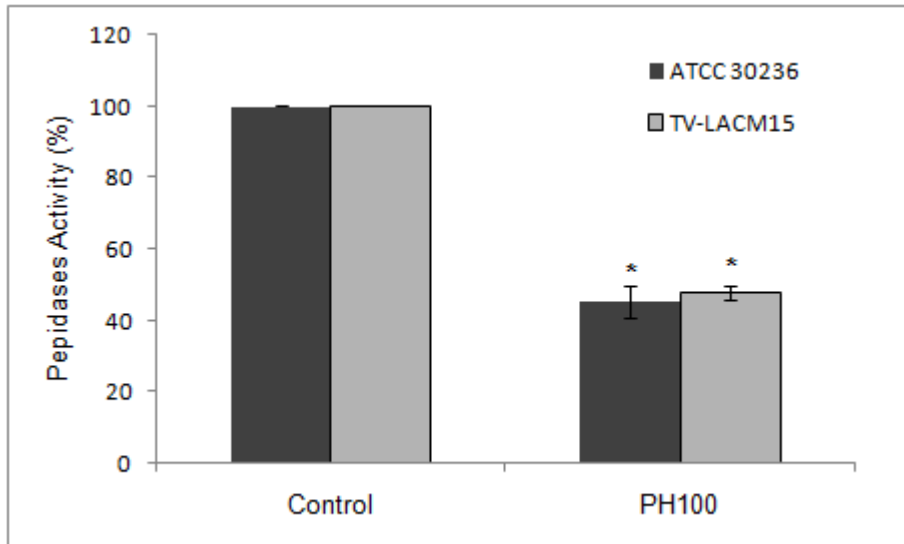


Fig. 8: Effect of **PH100** on peptidases activity. Data represent mean \pm standard deviation of three experiments in triplicate. (*) Statistically significant difference ($p < 0.05$) when compared to the negative control by the Student's *t* test.

3.10. Zymograms

This assay was carried out to assess the effect of **PH100** treatment on both ATCC and fresh clinical isolates and to obtain the main peptidases bands inhibited and/or activated by the treatment. The zymogram revealed two regions of active bands in each isolate that were different in treated trophozoites in comparison to controls. In both cases, ATCC 30236 and TV-LACM15 isolates treated with **PH100** at IC₅₀ for 24 h, presented darker bands of treated organisms than control (~35 kDa and ~25 kDa, Fig. 9B) indicating inhibition or reduction of peptidases activity, and lighter bands (~80 kDa, Fig. 9B) indicating increase of peptidases activity.

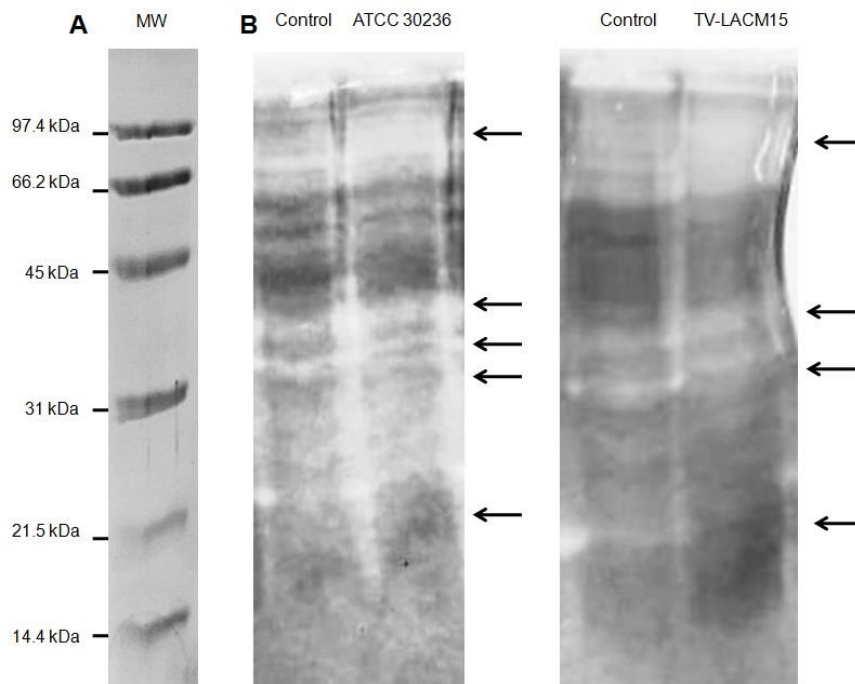


Fig. 9: Peptidase zymogram after 24 h of incubation with **PH100** at IC_{50} . **A)** SDS-PAGE without gelatin. **B)** Zimograms of ATCC 30236 and TV-LACM15 treated or not.

4. Discussion

Trichomoniasis is the most common non-viral STI in the world, with incidence numbers much higher than *Chlamydia* infections, gonorrhea, and syphilis combined (Secor et al., 2014). In spite of being a prevalent disease and cause of relevant health complications, trichomoniasis is a neglected disease (Secor et al., 2014). The difficulties in treatment and the lack of therapeutic alternatives encourage the research of new drugs. Several compounds, such as metallodrugs (Rigo et al., 2019), betulinic acid derivatives (Hübner et al., 2014), saponins (Vieira et al., 2017), have been studied for anti-*T. vaginalis* activity. The studies exhibit diverse mechanisms of action, for example, the effect on the metabolism of polyamines (Rigo et al., 2017), alterations of the cytoplasmic membrane (Rocha et al., 2014), hydrogenosome related action (Mallo et al., 2013) and cellular death by paraptosis (Giordani et al., 2011) (details in Bala and Chhonker, 2018).

Studies have shown that derivatives of quinazoline show activity against protozoa, such as inhibition of dihydrofolate reductase in *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, and *Plasmodium vivax* (Martínez et al., 2015) and modification of the *Toxoplasma gondii* structure preventing its entry in host cells (El-Tombary et al., 1999). The present study we tested the anti-*T. vaginalis* activity of 2,4-diamine-quinazoline derivative (**PH100**) using the ATCC 30236, TV-LACM15, TV-LACM22 and TV-LACH4 isolates. **PH100** showed MIC of 90 and 80 μM , for ATCC 30236 and TV-LACM15, respectively, and good IC_{50} values for all tested isolates. The compound also abolished the trophozoites proliferation in 24 h, with significant reduction in parasites growth in 4 hours at MIC concentration and in 12 h at IC_{50} concentration. Regarding cytotoxicity, the derivative tested presented no hemolytic effect and high selectivity index (>10), showing higher affinity to trichomonads than to erythrocytes and presented low cytotoxicity against all three cell lineages, HMVII, VERO, and 3T3-C1, revealing the promising and selective anti-*T. vaginalis* activity. Moreover, a synergic effect was observed by carrying out the checkerboard assay using metronidazole ($\geq 4.22 \mu\text{M}$) in combination with **PH100** ($\geq 14.8 \mu\text{M}$). These results demonstrate that the concentration necessary for treatment reduces when **PH100** is associated with the drug of choice, metronidazole, and indicate different mechanisms of action. A combination therapy besides of decrease sides effects and necessary administration dose is an alternative to scape to resistance mechanisms (Mohammadi-Berenjestanaki et al., 2019).

In sequence, the active compounds were tested against three fresh clinical *T. vaginalis* isolates: TV-LACM15, TV-LACM22, and TV-LACH4. These isolates present different occurrences of symbiosis infections with *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas virus* species (TVV) (Becker et al., 2015). TVV are the first linear double-stranded RNA viruses observed in protozoans (Wang et al., 1991). TVV are divided in four viral species based on genomic sequences: TVV1, TVV2, TVV3, and TVV4, that can coexist or not in the same organism. *T. vaginalis* virulence can be affected by TVV, like the ability to evade the host immune defenses (Fichorova et al., 2017). **PH100** showed the best results for all isolates with IC_{50} values for ATCC 30236 and TV-LACM15 of 50 μM and 14.8 μM , respectively. These differences of values are intriguing and can be

related to the presence of endosymbionts TVV that upregulate the expression of cysteine peptidases involved in virulence factors such as cytoadherence, cytotoxicity, and host immune evasion (Fichorova et al., 2012). In addition, when tested against the fresh clinical isolates TV-LACM22 (with no TVV) and TV-LACH4 (harboring all TVV 1, 2, 3, and 4), **PH100** showed IC₅₀ values higher than that for TV-LACM15, with no TVV. This issue should be further explored by testing **PH100** effect in a higher number of *T. vaginalis* isolates with different profiles of TVV harboring since the commensal relationship between *T. vaginalis* and TVV impairs the experimental infection and/or removal of TVV (Graves et al. 2019).

The redox balance is an important survival mechanism of *T. vaginalis*, because it avoids oxidative stress (Pal, 2012). This pathway shows resistance mechanisms highlighting the need to develop further research in this area (Schwebke and Barrientes, 2006). Results show that treatment with **PH100** at IC₅₀ did not induce production of reactive oxygen species in *T. vaginalis*. Based on this finding, the interference of **PH100** on parasite redox balance pathway can be probably ruled out.

Annexin V-FITC assay was conducted with the aim to investigate the type of cell death derivate from the compound action. Annexin V conjugated with FITC bind to phosphatidylserine exposed on plasmatic membrane and propidium iodide detects dead cells. The apoptotic cells show green fluorescence, dead cells show red and live cells shows no fluorescence that is detected by flow cytometry (Shynkar et al., 2007). The ATCC 30236 isolate showed fluorescent unities in characteristic regions, indicating that the probable type of cell death caused by the action of **PH100** is apoptosis-like. Conversely and intriguing, **PH100**-treated TV-LACM15 trichomonads did not present fluorescence, not differing from control and revealing distinct findings between the ATCC and fresh clinical isolates.

Scanning electron microscopy revealed alterations in *T. vaginalis* morphology from characteristic pyriform to pseudocyst formation with internalization of flagella. This shape is commonly observed in response to stress conditions as nutrient depletion and presence of drugs (Benchimol, 2004). Additional morphological changes could be observed, with formation of

blebbing, cellular membrane protrusions commonly associated with apoptosis (Charras, 2008). These results corroborate to Annexin V positive for ATCC 30236 isolate, suggesting apoptosis-like as mechanism of action of **PH100** for the long-term-grown isolate.

In order to investigate the mechanism of cell death and differences between ATCC and fresh clinical isolates tested in this study, the gene expression of enzymes involved in the apoptosis process in other organisms was analyzed. The homology of enzymes sequences in *T. vaginalis* was performed considering low similarity with human sequences using TrichDB (<https://trichdb.org/trichdb/>). PARP is responsible for DNA repair, transcription, cell cycle, cell death, and genomic integrity (Cao et al., 2019); hence, its increased gene expression decreases apoptosis induction. The treatment with **PH100** did not alter the enzyme gene expression in ATCC 30236 and increased (50%) in TV-LACM15, excluding it as possible target. On the other side, TvCatD is responsible for protein catabolism and plays an anti-apoptotic role (Bach et al., 2015). Previous studies associate TvCatD with human hemoglobin toxicity during trichomoniasis (Mancilla-Olea et al., 2018). Our results demonstrate that, as expected, in the ATCC 30236 isolate the gene expression of TvCatD was strongly reduced (80%) and the opposite effect occurred with the fresh TV-LACM15 isolate, with an increase (60%) in TvCatD gene expression, reinforcing the phenomenon of cell death by apoptosis-like only in the ATCC long-term-grown isolate. Another peptidase, cathepsin B-like, plays a fundamental role in turnover of intracellular and extracellular proteins as well as in apoptosis, by degrading a number of anti-apoptotic proteins (Cavallo-Medvet et al., 2011). In fact, **PH100** induced a significant increase in the gene expression of cathepsin B-like in both isolates, highlighting the strong enhance (35-fold) in the TV-LACM15 fresh clinical isolate. This result is intriguing since cathepsin B-like stimulates apoptosis and its gene expression was increased in the isolate that did not show apoptosis-like features.

The TvCP2 has been characterized as virulence factor of *T. vaginalis*. The characterization of this peptidase is not complete, but it has been found in a region of ~30 kDa and is localized on the parasite surface and in vesicles near plasma membrane (Arroyo et al., 2015). Miranda-Ozuna et al. (2019) showed

that TvCP2 participates in *T. vaginalis* cytotoxicity against host cells, inducing apoptosis, and peptidase expression increase under stress conditions during infection, such as glucose restriction. Another study has shown that iron restriction leads to increased TvCP2 activity and, consequently, the ability to induce apoptosis (Kummer et al., 2007). Thus, the parasite is able to modulate gene expression of this and other peptidases that are related to virulence factors. In *T. vaginalis*, TvCP2, has not been related to apoptosis yet, but in other organisms it is associated with cell proliferation and differentiation, being responsible for resistance to chemotherapy and for cancer cell invasion (Sui et al., 2016). Therefore, an increase in gene expression of this peptidase results in increased apoptosis. Our results showed that the treatment with **PH100** of ATCC 30236 and TV-LACM15 strongly reduced the gene expression (80%), suggesting that TvCP2 is not related with apoptosis-like in both long-term-grown and fresh clinical isolates. Based on our data we can hypothesize that **PH100** reduced the gene expression of the peptidase TvCP2, responsible for host cell toxicity, in both isolates, and **PH100** may contribute to get rid of the infection by attenuation of virulence factors. In the same way, calpain-like is responsible for cell differentiation, proliferation, and death (Liu et al., 2019). The gene expression of calpain-like was significantly reduced, 80% and 50% for ATCC 30236 and TV-LACM15 isolates, respectively, after **PH100** treatment. Considering that calpain-like has antagonist roles such as cell proliferation and death, its gene expression reduction may still be related to apoptosis-like triggering in the long-term-grown isolate.

In the perspective to understand the mechanism of cell death caused by **PH100** exposure, the gene expression of APLT-1, an enzyme responsible for the sequestration of phosphatidylserine in the cytosolic leaflet of plasma membranes (Dolis et al., 1997), was carried out. Previous studies show that exposure of this membrane phospholipids on the cell surface is a feature of apoptosis and plays an important role in promoting apoptosis (Van den Eijnde et al., 1998). Our results show that **PH100** treatment increased the gene expression of APLT-1 in the TV-LACM15 fresh clinical isolate, stimulating the sequestration of phosphatidylserine with no Annexin V binding. On the other hand, **PH100**-treated ATCC 30236 presented a decrease in the APLT-1 gene

expression resulting in exposure of phosphatidylserine on the outside of the plasmatic membrane allowing Annexin V binding and labelling of apoptotic-like trophozoites. Taking all together, the results of gene expression suggest that the treatment of *T. vaginalis* with **PH100** at IC₅₀ for 24 h induced distinct profiles of programmed cell death in long-term-grown and fresh clinical isolates different of classical apoptosis (Table 4). Moreover, theoretically, alterations in gene expression can lead to altered protein levels, but the still unknown steps between transcription and translation provide many different regulatory processes. Molecules trigger intercellular signaling cascades that cause changes in transcription or expression of genes. Such changes in gene expression can include turnover of genes or just slightly adjust the level of transcript produced (Ralston and Shaw, 2008). Therefore, transcription analysis by gene expression themselves are not sufficient to predict protein levels (Liu et al., 2016).

Peptidases are enzymes responsible for protein cleavage. *T. vaginalis* has about 440 genes encoding peptidases: 220 cysteine-like (CP), 123 metallo-like (MP), 80 serine (SP), 17 threonine (TP), and 6 aspartic peptidases (AP) (67 Arroyo et al., 2015). Peptidases act as virulence factors in trichomoniasis and may be located on the surface of the plasma membrane or secreted (Figueroa-Angulo et. al., 2012). Results presented in this study show that **PH100** modulates the expression of enzymes, including peptidases. Therefore, azocasein assay was performed to investigate the effect of the compound on the activity of peptidases. Reduction (60%) in total peptidase activity was observed for both **PH100**-treated isolates. In order to identify which peptidases had activities modified by treatment with compound, peptidases zymograms were made from SDS-PAGE on 12.5% polyacrilamide gel co-polymerized with 1.0% gelatin. Modifications were possible to be observed in peptidase activity from the band analysis, comparing trophozoites treated with **PH100** at IC₅₀ for 24 h and untreated. Both treated ATCC 30236 and TV-LACM15 isolates showed lighter bands of higher molecular weight (~80 kDa), indicating peptidases that had increased activity by treatment with **PH100**. Conversely, darker bands of lower molecular weight (~25 and ~35 kDa) peptidases had their activity decreased or inhibited by the treatment. Taking into account the

correlation between gene expression data with zymograms it can be suggested that the derivative **PH100** modulates both peptidases gene expressions and activities. **PH100** reduced calpain-like (a cysteine peptidase, ~80 kDa) gene expression for both isolates (Carragher, 2006); however, zymograms showed lighter bands in this region of molecular weight, indicating increased peptidase activity. TvCP2 gene expression (a cysteine peptidase, ~30 kDa) was reduced in both isolates by the compound and in this case, the activity was also reduced or inhibited, showing darker band in this region in the zymogram gel. **PH100** treatment reduced TvCatD (an aspartic peptidase, ~35 kDa) gene expression (Mancilla-Olea et al., 2018) in ATCC30236 isolate and the zymogram showed darker band in this region, suggesting decreased or inhibited activity. Likewise, cathepsin B-like (a cysteine peptidase, ~38 kDa) (Cavallo-Medved et al., 2011) gene expression was significantly increased by **PH100** treatment for both isolates and could be related to the lighter bands present in zymograms in this region indicating increased peptidase activity. Darker regions were observed in zymograms with molecular weights of ~21 kDa not related to the peptidases analyzed by qRT-PCR. For confirmation of results and identification of involved peptidases, bands should be extracted from zymograms and analyzed by mass spectroscopy.

Table 4: Gene expression of enzymes (ATCC 30236 and TV-LACM15) treated with **PH100** at IC₅₀ for 24 h and function of enzymes and relation expression/apoptosis.

Enzyme	Function	Expression/Apoptosis	mRNA expression with PH100 treatment	
			ATCC 30236	TV-LACM15
Poly [ADP-Ribose] Polymerase	DNA repair, transcription, cell cycle, cell death and genomic integrity	↓ = ↑	N.A.	↑
Cathepsin D-like	Protein catabolism; Stimulates proliferation cancer cells	↓ = ↑	↓	↑
Cathepsin B-like	Turnover of intracellular and extracellular proteins; Play an important role in apoptosis degrading a number of anti-apoptotic proteins	↑ = ↑	↑	↑↑
Cathepsin L-like	Initiation of protein degradation/ Turnover of intracellular and extracellular proteins	↑ = ↑	↓	↓
Calpain	Cell differentiation, proliferation and death	↑ = ↑	↓	↓
Aminophospholipid translocase	Responsible for the sequestration of phosphatidylserine in the cytosolic leaflet of plasma membranes	↓ = ↑	↓	↑↑

N.A.= not altered.

5. Conclusions

Overall, the results suggest that **PH100** presents anti-*T. vaginalis* activity by modulating gene expression and activity of peptidases triggering apoptosis-like cell death. Interestingly, **PH100** differentially affects long-term-grown and fresh clinical *T. vaginalis* isolates by distinct values of IC₅₀. This finding allow us to hypothesize that the distinct susceptibility to **PH100** may be related to the presence or not of endosymbionts TVV. This issue should be further explored by testing **PH100** effect in a higher number of isolates with different profiles of TVV harboring. Moreover, this compound offers potential alternative to trichomoniasis treatment since the mechanism of action is distinct from known

resistance pathways. Mass spectrometry and proteome analysis are in progress to identify the **PH100** modulated peptidases.

6. Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Brazil) grant#428538/2018-5 (TT), PRONEM-FAPERGS (Brazil) grant #16/2551-0000244-4, and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) Finance Code 001. JIW is thankful to CAPES (Brazil) for a master in science fellowship (grant #345887/2019-1). TT thanks CNPq for researcher fellowship (grant #312292/2017-1). The valuable discussion on zymograms technical development is acknowledged to Professor Lucélia Santi, Faculdade de Farmácia, UFRGS. The authors thank Centro de Microscopia e Microanálise (CMM/UFRGS) for technical assistance.

7. Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References:

Abuelizz, H. A., Hassane, A. E., Marzouk, M., Ezzeldin, E., Ali, A. A., & Al-Salahi, R. Molecular modeling, enzyme activity, anti-inflammatory and antiarthritic activities of newly synthesized quinazoline derivatives. *Future medicinal chemistry* 2017, 9(17): 1995-2009. doi: 10.4155/fmc-2017-0157.

Ali, V., & Nozaki, T. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by “amitochondriate” protozoan parasites. *Clinical microbiology reviews* 2007, 20(1): 164-187. Doi: 10.1128/CMR.00019-06

Arroyo, R., Cárdenas-Guerra, R. E., Figueroa-Angulo, E. E., Puente-Rivera, J., Zamudio-Prieto, O., & Ortega-López, J. *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases: iron response in gene expression and proteolytic activity. *BioMed research international*, 2015. doi: 10.1155/2015/946787.

Bach, A. S., Derocq, D., Laurent-Matha, V., Montcourrier, P., Sebti, S. S., Orsetti, B., Theillet C, Gongora C, Patingre S, Ibing E, Roger P, Linares LK, Reinheckel T, Meurice G, Kaiser FJ, Gespach C, Liaudet-Coopman E. Nuclear cathepsin D enhances TRPS1 transcriptional repressor function to regulate cell cycle progression and transformation in human breast cancer cells. *Oncotarget* 2015, 6(29), 28084. doi: 10.18632/oncotarget.4394.

Bala, V., & Chhonker, Y. S. Recent developments in anti-*Trichomonas* research: An update review. *European journal of medicinal chemistry* 2018, 143: 232-243. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.11.029.

Benchimol, M. Trichomonads under microscopy. *Microscopy and Microanalysis* 2004, 10(5): 528-550. Doi: 10.1017/S1431927604040905

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976, 72(1-2), 248-254. Doi: 10.1006/abio.1976.9999

Cao, S., Sun, Y., Wang, W., Wang, B., Zhang, Q., Pan, C., Yuan Q, Xu F, Wei S, Chen, Y. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via suppressing mitophagy. *Journal of cellular and molecular medicine* 2019. doi: 10.1111/jcmm.14573.

Cavallo-Medved, D., Moin, K., & Sloane, B. Cathepsin B: Basis Sequence: Mouse. *The AFCS-nature molecule pages*, 2011.

Charras, G. T. A short history of blebbing. *Journal of microscopy* 2008, 231(3): 466-478. doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02059.x.

da Luz Becker, D., dos Santos, O., Frasson, A. P., de Vargas Rigo, G., Macedo, A. J., & Tasca, T. High rates of double-stranded RNA viruses and *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* clinical isolates in South Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 2015, 34: 181-187. doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.005.

Das, P., Estephan, R., & Banerjee, P. Apoptosis is associated with an inhibition of aminophospholipid translocase (APTL) in CNS-derived HN2-5 and HOG cells and phosphatidylserine is a recognition molecule in microglial uptake of the apoptotic HN2-5 cells. *Life sciences* 2003, 72(23), 2617-2627. Doi: 10.1016/s0024-3205(03)00163-2

de Brum Vieira, P., Silva, N. L. F., Menezes, C. B., da Silva, M. V., Silva, D. B., Lopes, N. P., Macedo AJ, Bastida J, Tasca, T. Trichomonocidal and parasite membrane damaging activity of bidesmosic saponins from *Manilkara rufula*. *PloS one* 2017, 12(11), e0188531. doi: 10.1371/journal.pone.0188531.

de Castro Barbosa, M. L., Lima, L. M., Tesch, R., Sant'Anna, C. M. R., Totzke, F., Kubbutat, M. H., Schächtele C, Laufer SA, Barreiro, E. J. Novel 2-chloro-4-anilinoquinazoline derivatives as EGFR and VEGFR-2 dual inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* 2014, 71: 1-14. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.10.058.

Diamond, L. S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *The Journal of parasitology* 1957, 43(4): 488-490.

Dolis, D., Moreau, C., Zachowski, A., & Devaux, P. F. Aminophospholipid translocase and proteins involved in transmembrane phospholipid traffic. *Biophysical chemistry* 1997, 68(1-3): 221-231. Doi: 10.1016/s0301-4622(97)00048-3

dos Santos, O., de Vargas Rigo, G., Frasson, A. P., Macedo, A. J., & Tasca, T. Optimal reference genes for gene expression normalization in *Trichomonas vaginalis*. *PloS one* 2015, 10(9), e0138331. doi: 10.1371/journal.pone.0138331.

Dubey, V., & Luqman, S. Cathepsin D as a Promising Target for the Discovery of Novel Anticancer Agents. *Current cancer drug targets* 2017, 17(5), 404-422. doi: 10.2174/1568009616666161229145115.

El-Tombary, A. A., Ismail, K. A., Aboulwafa, O. M., Omar, A. M. M., El-Azzouni, M. Z., & El-Mansoury, S. T. Novel triazolo [4, 3-a] quinazolinone and bis-triazolo [4, 3-a: 4, 3'-c] quinazolines: synthesis and antitoxoplasmosis effect. *Il Farmaco* 1999, 54(7): 486-495.

Fichorova, R. N., Lee, Y., Yamamoto, H. S., Takagi, Y., Hayes, G. R., Goodman, R. P., Chepa-Lotrea X, Buck OR, Murray R, Kula T, Beach DH, Singh BN, Nibert ML. Endobiont viruses sensed by the human host—beyond conventional antiparasitic therapy. *PLoS one* 2012, 7(11), e48418. doi: 10.1371/journal.pone.0048418.

Fichorova, R., Fraga, J., Rappelli, P., & Fiori, P. L. *Trichomonas vaginalis* infection in symbiosis with *Trichomonasvirus* and *Mycoplasma*. *Research in microbiology* 2017, 168(9-10): 882-891. doi: 10.1016/j.resmic.2017.03.005.

Figuroa-Angulo, E. E., Rendón-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Calla-Choque, J. S., Cárdenas-Guerra, R. E., Ortega-López, J., Quintas-Granados LI, Alvarez-Sánchez ME, Arroyo, R. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and infection* 2012, 14(15), 1411-1427. doi: 10.1016/j.micinf.2012.09.004.

Gellis, A., Primas, N., Hutter, S., Remusat, V., Verhaeghe, P., Vanelle, P., & Azas, N. Looking for new antiplasmodial quinazolines: DMAP-catalyzed synthesis of 4-benzyloxy-and 4-aryloxy-2-trichloromethylquinazolines and their in vitro evaluation toward *Plasmodium falciparum*. *European journal of medicinal chemistry* 2016, 119: 34-44. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.04.059.

Giordani, R. B., de Brum Vieira, P., Weizenmann, M., Rosemberg, D. B., Souza, A. P., Bonorino, C., De Carli GA, Bogo MR, Zuanazzi JA, Tasca, T. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry* 2011, 72(7): 645-650. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.01.023.

Graves, K. J., Ghosh, A. P., Schmidt, N., Augostini, P., Secor, W. E., Schwebke, J. R., ... & Muzny, C. A. *Trichomonas vaginalis* Virus Among Women With Trichomoniasis and Associations With Demographics, Clinical Outcomes, and Metronidazole Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 2019. doi: 10.1093/cid/ciz146

Hirt, R. P., & Sherrard, J. *Trichomonas vaginalis* origins, molecular pathobiology and clinical considerations. *Current opinion in infectious diseases* 2015; 28(1): 72-79. doi: 10.1097/QCO.000000000000128.

Hobbs, M. M., & Seña, A. C. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Transm Infect* 2013; 89(6): 434-438. doi: 10.1136/sextrans-2013-051057.

Hübner, D. P. G., de Brum Vieira, P., Frasson, A. P., Menezes, C. B., Senger, F. R., da Silva, G. N. S., Baggio Gnoatto SC, Tasca, T. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of betulinic acid derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016, 84, 476-484. doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.064.

Ibrahim, M. K., Eissa, I. H., Alesawy, M. S., Metwaly, A. M., Radwan, M. M., & ElSohly, M. A. Design, synthesis, molecular modeling and anti-hyperglycemic evaluation of quinazolin-4 (3H)-one derivatives as potential PPAR γ and SUR agonists. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2017, 25(17): 4723-4744. doi: 10.1016/j.bmc.2017.07.015.

Jarrar, A., Lotti, F., DeVecchio, J., Ferrandon, S., Gantt, G., Mace, A., Karagkounis G, Orloff M, Venere M, Hitomi M, Lathia J, Rich JN, Lathia, J. Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibition Sensitizes Colorectal Cancer-Initiating Cells to Chemotherapy. *Stem Cells* 2019 , 37(1), 42-53. doi: 10.1002/stem.2929.

Kant, S., Asthana, S., Missiakas, D., & Pancholi, V. A novel STK1-targeted small-molecule as an “antibiotic resistance breaker” against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports* 2017, 7(1): 5067. doi: 10.1038/s41598-017-05314-z.

Kiss, T., Fenyvesi, F., Bácskay, I., Váradi, J., Fenyvesi, E., Iványi, R., Szente L, Tósaki A, Vecsernyés, M. Evaluation of the cytotoxicity of β -cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction. *European journal of pharmaceutical sciences* 2010, 40(4), 376-380. doi: 10.1016/j.ejps.2010.04.014.

Kissinger P. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 307. doi: 10.1186/s12879-015-1055-0.

Kummer, S., Hayes, G. R., Gilbert, R. O., Beach, D. H., Lucas, J. J., & Singh, B. N. Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microbial pathogenesis* 2008, 44(3), 197-203. doi: 10.1016/j.micpath.2007.09.004

Li, Z., Wang, B., Hou, J. Q., Huang, S. L., Ou, T. M., Tan, J. H., An LK, Li D, Gu LQ, Huang, Z. S. 2-(2-indolyl)-4 (3 H)-quinazolines derivates as new inhibitors of AChE: design, synthesis, biological evaluation and molecular modelling. *Journal of enzyme*

inhibition and medicinal chemistry 2013, 28(3): 583-592. doi: 10.3109/14756366.2012.663363.

Liu, Y., Beyer, A., & Aebersold, R. On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell* 2016, 165(3), 535-550. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.014.

Liu, Z. X., Yu, K., Dong, J., Zhao, L., Liu, Z., Zhang, Q., Li S, Du Y, Cheng, H. Precise prediction of calpain cleavage sites and their aberrance caused by mutations in cancer. *Frontiers in genetics* 2019, 10. doi: 10.3389/fgene.2019.00715.

Mallo, N., Lamas, J., & Leiro, J. M. Hydrogenosome metabolism is the key target for antiparasitic activity of resveratrol against *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2013, 57(6): 2476-2484. doi: 10.1128/AAC.00009-13.

Mancilla-Olea, M. I., Ortega-López, J., Figueroa-Angulo, E. E., Avila-González, L., Cárdenas-Guerra, R. E., Miranda-Ozuna, J. F., González-Robles A, Hernández-García MS, Sánchez-Ayala L, Arroyo, R. *Trichomonas vaginalis* cathepsin D-like aspartic proteinase (Tv-CatD) is positively regulated by glucose and degrades human hemoglobin. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2018, 97, 1-15. doi: 10.1016/j.biocel.2018.01.015.

Mendoza-Martínez, C., Correa-Basurto, J., Nieto-Meneses, R., Márquez-Navarro, A., Aguilar-Suárez, R., Montero-Cortés, M. D., Noguera-Torres B, Suárez-Contreras E, Galindo-Sevilla N, Rojas-Rojas Á, Rodríguez-Lezama A, Rodríguez-Lezama, A. Design, synthesis and biological evaluation of quinazoline derivatives as anti-trypansomatid and anti-plasmodial agents. *European journal of medicinal chemistry* 2015, 96: 296-307. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.028.

Menezes CB, Frasson AP, Tasca T. Trichomoniasis – are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? *Microbial cell* 2016; 3(9): 404-19. doi: 10.15698/mic2016.09.526.

Miranda-Ozuna, J. F., Rivera-Rivas, L. A., Cárdenas-Guerra, R. E., Hernández-García, M. S., Rodríguez-Cruz, S., González-Robles, A., Chavez-Munguía B, Arroyo, R. Glucose-restriction increases *Trichomonas vaginalis* cellular damage towards HeLa cells and proteolytic activity of cysteine proteinases (CPs), such as TvCP2. *Parasitology* 2019, 1-11. doi: 10.1017/S0031182019000209.

Mohammadi-Berenjestanaki, H., Khorri, V., Shirzad-Aski, H., & Ghaemi, E. A. In Vitro Synergistic Effect of Vancomycin and Some Antibacterial Agents Against Clinical

Methicillin-Resistant and Sensitive *Staphylococcus aureus* Isolates. *Microbial Drug Resistance* 2019. doi: 10.1089/mdr.2019.0003.

Odds, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003, 52(1): 1-1. Doi: 10.1093/jac/dkg301

Pal, C., & Bandyopadhyay, U. Redox-active antiparasitic drugs. *Antioxidants & redox signaling* 2012, 17(4): 555-582. doi: 10.1089/ars.2011.4436.

Pathak, SR., Malhotra, V., Nath, R., & Shanker, K. Synthesis and antihypertensive activity of novel quinazolin-4 (3H)-one derivatives. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry. Formerly Current Medicinal Chemistry- Central Nervous System Agents* 2014, 14(1): 34-38.

Poole, D.N.; McClelland, R.S. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually Transmitted Infection* 2013; 89(6):418-422. doi: 10.1136/sextrans-2013-051075.

Ralston, A., & Shaw, K. Gene expression regulates cell differentiation. *Nat Educ* 2008, 1(1): 127-31.

Ravez, S., Castillo-Aguilera, O., Depreux, P., & Goossens, L. Quinazoline derivatives as anticancer drugs: a patent review (2011–present). *Expert opinion on therapeutic patents* 2015, 25(7): 789-804. doi: 10.1517/13543776.2015.1039512.

Rigo, G. V., Petro-Silveira, B., Devereux, M., McCann, M., dos Santos, A. L. S., & Tasca, T. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of 1, 10-phenanthroline-5, 6-dione-based metallodrugs and synergistic effect with metronidazole. *Parasitology* 2019, 146(9): 1179-1183. doi: 10.1017/S003118201800152X.

Rigo, G. V., Trein, M. R., da Silva Trentin, D., Macedo, A. J., de Oliveira, B. A., de Almeida, A. M., Giordani RB, de Almeida MV, Tasca, T. Diamine derivative anti-*Trichomonas vaginalis* and anti-*Tritrichomonas foetus* activities by effect on polyamine metabolism. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017, 95: 847-855. doi: 10.1016/j.biopha.2017.09.007.

Rocha, D. A. S., de Andrade Rosa, I., Urbina, J. A., de Souza, W., & Benchimol, M. The effect of 3-(biphenyl-4-yl)-3-hydroxyquinuclidine (BPQ-OH) and metronidazole on *Trichomonas vaginalis*: a comparative study. *Parasitology research* 2014, 113(6), 2185-2197. doi: 10.1007/s00436-014-3871-3.

Rowley, Jane et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bulletin of the World Health Organization* 2019, 97(8), 548. doi: 10.2471/BLT.18.228486.

Sato, K., & Kawashima, S. Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. *Biological chemistry* 2001, 382(5), 743-752. Doi: 10.1515/BC.2001.090

Schwebke JR, Barrientes FJ. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 4209-10. doi: 10.1128/AAC.00814-06

Secor, W. E., Meites, E., Starr, M. C., & Workowski, K. A. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2014, 90(5): 800-804. doi: 10.4269/ajtmh.13-0723.

Shen, X., Zhao, Y. F., Xu, S. Q., Wang, L., Cao, H. M., Cao, Y., Zhu, Y., Wang, Y., Liang, Z. Q. Cathepsin L induced PC-12 cell apoptosis via activation of B-Myb and regulation of cell cycle proteins. *Acta pharmacologica Sinica* 2019, 1-10. doi: 10.1038/s41401-019-0286-9.

Shynkar, V. V., Klymchenko, A. S., Kunzelmann, C., Duportail, G., Muller, C. D., Demchenko, A. P., Freyssinet, JM, Mely, Y. Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis. *Journal of the American Chemical Society* 2007, 129(7), 2187-2193. Doi: 10.1021/ja068008h

Sui, H., Shi, C., Yan, Z., & Wu, M. Overexpression of Cathepsin L is associated with chemoresistance and invasion of epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* 2016, 7(29), 45995. doi: 10.18632/oncotarget.10276

Tang, B., Wei, M., Niu, Q., Huang, Y., Ru, S., Liu, X., Shen, L., Fang, Q. Antimicrobial Activity of Quinazolin Derivatives of 1, 2-Di (quinazolin-4-yl) diselane against *Mycobacteria*. *BioMed research international*, 2017. doi: 10.1155/2017/5791781.

Van den Eijnde, S. M., Boshart, L., Baehrecke, E. H., De Zeeuw, C. I., Reutelingsperger, C. P. M., & Vermeij-Keers, C. Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved. *Apoptosis* 1998, 3(1): 9-16.

Wang, A. L., & Wang, C. C. Viruses of the protozoa. *Annual review of microbiology* 1991, 45(1), 251-263. doi: 10.1146/annurev.mi.45.100191.001343

Zeng, M., Lu, J., Li, L., Feru, F., Quan, C., Gero, TW., Ficarro, SB., Xiong, Y., Ambrogio, C., Paranal, RM., Catalano, M., Shao, J., Wong, KK., Marto, JA., Fischer, ES., Jänne, PA., Scott, DA., Westover, KD., Gray, NS. Potent and selective covalent quinazoline inhibitors of KRAS G12C. *Cell chemical biology* 2017, 24(8): 1005-1016. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.06.017.

Supplementary material:

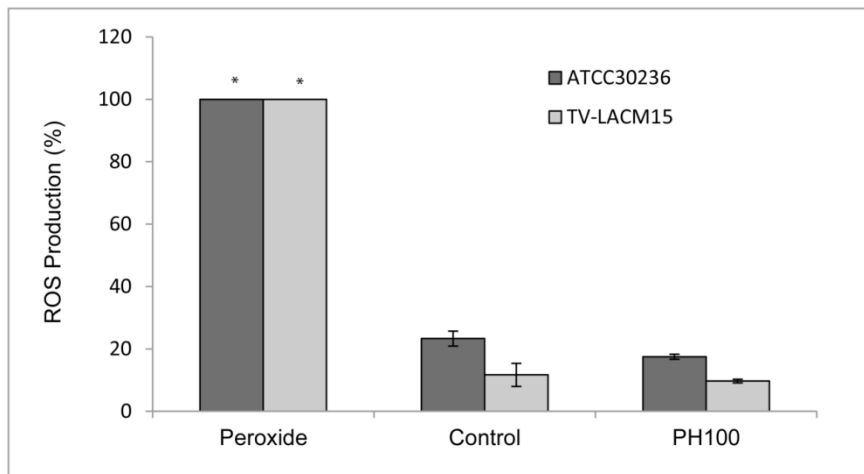


Fig S1:Effect of **PH100** on ROS production by *T. vaginalis*. Hydrogen peroxide was used as positive control. Data represent mean \pm standard deviation of three experiments in triplicate. (*) Statistically significant difference ($p < 0.05$) when compared to the negative control by the Student's *t* test.

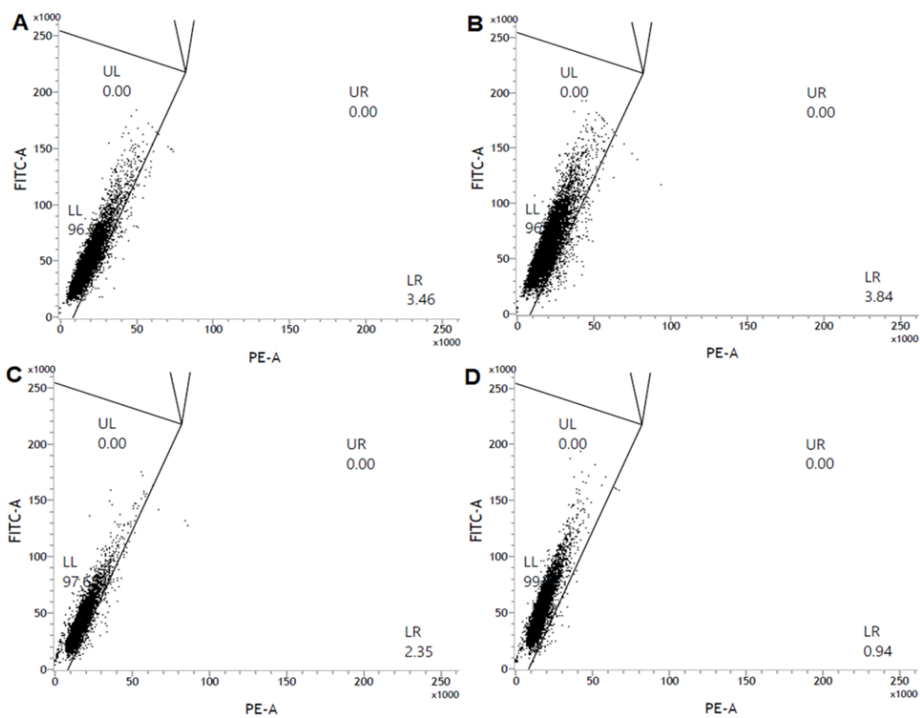


Fig S2:PH100 did not induce autophagy on *T. vaginalis*. **A)** ATCC 30236 with no treatment; **B)** ATCC 30236 with **PH100** at IC_{50} (50 μ M); **C)** TV-LACM15 clinical fresh isolate with no treatment; **D)** TV-LACM15 clinical fresh isolate with **PH100** at IC_{50} (14.8 μ M).

V. Discussão

O protozoário flagelado *Trichomonas vaginalis* é responsável por parasitar o trato urogenital feminino e masculino, causando a tricomoníase, infecção sexualmente transmissível (IST) de grande relevância na saúde pública. A tricomoníase é a IST não-viral mais prevalente no mundo. Estimativas mostram que em 2016 o número de novos casos de adultos, entre 15 e 49 anos, infectados por ISTs – entre elas: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, sífilis e tricomoníase – atingiu cerca de 376,4 milhões, sendo a infecção causada por *T. vaginalis* responsável por 156 milhões de casos (ROWLEY et al., 2019). Estudo realizado em 1987 na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, apresentou uma taxa de prevalência de tricomoníase de 37,5% entre mulheres gaúchas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Porém, os números encontrados são subestimados, pois a tricomoníase não é uma doença de notificação compulsória, o que gera incerteza nos registros epidemiológicos (POOLE E McCLELLAND, 2013). Além disso, essa IST é classificada como doença negligenciada sendo endêmica em países de baixa renda, apresentando baixo investimento em pesquisas para desenvolvimento de novos fármacos (SECOR et al., 2014).

A quinazolina é um heterociclo muito estudado, sendo três medicamentos já aprovados pelo FDA como anticâncer: gefitinib, erlotinib e lapatinib (RAVEZ et al., 2015). Estudos mostram que esta classe apresenta atividade contra diversos protozoários, como: anti-*Leishmania*, anti-*Trypanosoma*, anti-*Toxoplasma* e anti-*Plasmodium*, porém ainda não foi demonstrada atividade anti-*T. vaginalis*, sendo os resultados do presente estudo inéditos para derivados de quinazolina (MENDOZA-MARTÍNEZ et al., 2015; EL-TOMBARY et al., 1999).

Desta forma, o capítulo I deste trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade anti-*T. vaginalis* de derivado dissubstituído de 2,4-diaminoquinazolina e caracterização do mecanismo de ação. Estudo prévio do nosso grupo de pesquisa demonstrou que diferentes isolados podem apresentar diferentes perfis de co-infecção com endosimbiontes *Mycoplasma hominis* e *Trichomonasvirus* (TVV) (BECKER et al., 2015). Assim, os isolados clínicos frescos de *T. vaginalis* foram escolhidos para este estudo com base nas características distintas: TV-LACM15 não apresenta co-infecção com os

endosimbiontes *M. hominis* e TVV; TV-LACM22 que contém apenas *M. hominis* e TV-LACH4 que contém apenas TVV. Desta forma, tivemos como objetivo analisar esses diferentes perfis com os resultados obtidos. Importante, valores de IC₅₀ obtidos para esse composto foram muito diferentes quando comparados ATCC 30236 (50 µM) e TV-LACM15 (14,8 µM), sendo então escolhidos estes isolados para dar prosseguimento aos estudos.

De acordo com esses resultados, dois isolados foram selecionados para caracterização do mecanismo de ação de PH100: ATCC 30236, isolado cultivado em laboratório por longos períodos, e TV-LACM15, isolado clínico fresco que apresentou a maior suscetibilidade ao **PH100**. Com o objetivo de avaliar o perfil de inibição do composto nas concentrações de MIC e IC₅₀ na proliferação dos trofozoítos (ATCC 30236 e TV-LACM15) foram realizadas curvas de cinética de crescimento. A curva mostrou que 4 horas de incubação com a concentração de MIC de **PH100** é suficiente para inibição significativa do crescimento de ambos os isolados e em 6 horas a completa anulação de proliferação é observada, enquanto que para IC₅₀ são necessárias 12 horas de incubação. A fim de analisar a associação entre metronidazol e **PH100**, foi realizado ensaio de checkerboard, onde várias concentrações destes compostos foram testadas em conjunto. Assim, foi observada ação sinérgica quando utilizado metronidazol ($\geq 4,22 \mu\text{M}$) e **PH100** ($\geq 14,8 \mu\text{M}$) concomitantemente. Esse resultado indica que **PH100** e metronidazol agem por vias diferentes e o efeito sinérgico permite que doses mais baixas possam ser administradas para obter o efeito desejado (MOHHAMADI-BERENJESTANAKI et al., 2019). Além disso, a redução dos efeitos adversos e potencializaçãoda ação anti-parasitária são esperados, uma vez que a administração de agentes que atuem por mecanismos diferentes contribui para evitar os mecanismos de resistência que já foram descritos para o metronidazol.

Considerando os resultados obtidos para atividade anti-*T. vaginalis* dos seis compostos testados, pode-se concluir que a substituição do anel quinazolinico por outros heterociclos parece ser desfavorável, uma vez que os compostos **PH110** e **PH111**, que possuem uma pirimidina e uma purina, foram inativos. Desta forma, para síntese de novos derivados que visam atividade

contra esse protozoário, a permanência do anel quinazolínico parece ser importante.

Além da atividade anti-*T. vaginalis*, outros fatores que devem ser levados em consideração são citotoxicidade e hemólise. Desta forma, o índice de seletividade (IS) foi utilizado para determinar a seletividade do composto pelos trofozoítos e não pelas células do hospedeiro. Este índice é calculado pela razão CC_{50}/IC_{50} e indica se o dano causado pelo composto às células hospedeiras é menor que o dano causado ao parasito, portanto valores $\geq 1,0$ podem ser considerados bons, como obtidos por **PH100**, o qual também apresentou MIC, indicando potente atividade. Porém, alguns estudos mostram que o IS deve ser $\geq 5,0$ (GROGL et al., 2013) ou $\geq 10,0$ (NAVA-ZUAZO et al., 2010). Em relação à toxicidade frente aos eritrócitos, nenhum dos três compostos foi hemolítico, com ótimos índices de seletividade (IS >10).

Para sobrevivência do *T. vaginalis* é essencial manter o equilíbrio de oxidorredução para evitar estresse oxidativo (PAL, 2012). A fim de caracterizar o mecanismo de ação de **PH100**, foi realizada análise da indução da produção de espécies reativas de oxigênio por trofozoítos previamente tratados e não houve efeito significativo, indicando que este mecanismo não está envolvido na morte do parasito. Este resultado é interessante, visto que a via redox já apresenta mecanismos de resistência (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006).

Seguindo esta investigação foi realizado o ensaio de Anexina V-FITC (verde fluorescente) que se liga à fosfatidilserina exposta na membrana plasmática e o iodeto de propídio detecta células mortas (vermelho fluorescente). As células apoptóticas mostram fluorescência verde, as células mortas mostram vermelha, e as células vivas não mostram fluorescência detectada pela citometria de fluxo. Desta forma, o tratamento dos trofozoítos do isolado ATCC 30236 com **PH100** induziu a exposição de fosfatidilserina na membrana celular dos organismos, apresentando fluorescência na região característica de apoptose. Por outro lado, trofozoítos do isolado clínico fresco TV-LACM15 tratados com **PH100** não apresentaram fluorescência em região de apoptose, permitindo concluir que não houve indução de exposição de fosfatidilserina. Para investigar esta diferença, foi analisada a expressão gênica

por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qRT-PCR) de enzimas cujas funções foram descritas relacionadas à apoptose em diversas células. A homologia com enzimas presentes no genoma de *T. vaginalis* (TrichDB) foi definida e sequências com menor semelhança às enzimas humanas foram escolhidas. Uma das enzimas escolhidas foi aminofosfolípídeo translocase (APLT-1) que está associada à função de sequestro de fosfatidilserina. Diferença na expressão dos genes desta enzima foi observada entre os isolados após tratamento com **PH100**. Para ATCC 30236 houve diminuição da expressão de APLT-1, enquanto que para TV-LACM15 foi verificado aumento bastante significativo dessa expressão, indicando aumento do sequestro de fosfatidilserina, corroborando com os dados obtidos pelo ensaio de Anexina V-FITC. Alterações morfológicas nos trofozoítos (ATCC 30236) foram observadas através de microscopia eletrônica de varredura. Foi identificada alteração na conformação tradicional de piriforme para pseudocistos, com internalização dos flagelos. Essa forma é observada em condições de estresse, como depleção de nutrientes e presença de medicamentos (BENCHIMOL, 2004). Outras alterações observadas, foram a formação de protrusões da membrana celular geralmente associadas à apoptose (CHARRAS, 2008). Esses resultados, adicionalmente obtidos com o ensaio de Anexina V, sugerem apoptose-like como mecanismo de ação do **PH100** para o isolado ATCC 30236.

Outras enzimas relacionadas à apoptose que foram analisadas a nível de expressão gênica foram Poli [ADP-Ribose] Polimerase (PARP) responsável pelo reparo do DNA, transcrição, ciclo celular, morte celular e integridade genômica (CAO et al., 2019), portanto, o aumento da expressão leva à diminuição da indução de apoptose. O tratamento com **PH100** para ATCC 30236 não alterou a expressão da enzima, porém para TV-LACM15 houve aumento da expressão gênica de PARP, portanto esta enzima não está relacionada ao mecanismo de apoptose-like causada pelo composto. A enzima catepsina B-like desempenha um papel fundamental na renovação das proteínas intracelulares e extracelulares e um papel importante na apoptose, degradando uma série de proteínas anti-apoptóticas (CAVALLO-MEDVET et al., 2011), assim a expressão aumentada dessa enzima leva ao aumento da apoptose. **PH100** induziu um aumento na expressão dessa enzima em ambos

os isolados e, para TV-LACM15, o aumento foi muito significativo, de acordo com os resultados podemos indicar que esta enzima está envolvida no mecanismo de ação desse composto. A catepsina D-like (TvCatD) é responsável pelo catabolismo protéico e estimula a proliferação de células cancerígenas, desempenhando um papel anti-apoptótico (BACH et al., 2015). Assim, a diminuição da expressão leva ao aumento da apoptose, isso ocorreu com o ATCC 30236 tratado com **PH100**, mas não com TV-LACM15, conforme esperado. Outra enzima avaliada foi calpaína, responsável pela diferenciação celular, proliferação e morte (LIU et al., 2019), assim, o aumento da expressão leva ao aumento da apoptose. A catepsina L-like (TvCP2) é relacionada com a proliferação de células cancerígenas, dessa forma o aumento da expressão leva ao aumento de apoptose. O composto **PH100** reduziu a expressão gênica da calpaína e da TvCP2 em ambos os isolados tratados, indicando que essas enzimas estão relacionadas com a morte celular causada pelo composto em *T. vaginalis*.

Com relação ao ensaio de laranja de acridina, ambos isolados não apresentaram características de autofagia quando tratadas por 24 horas com PH100 em seus respectivos valores de IC₅₀. Diferentes tempos de tratamento devem ser testados antes de excluir por completo esse mecanismo de morte para *T. vaginalis*, uma vez que ainda é discutido se a autofagia é uma via de escape da morte na qual os organismos tentam resolver desequilíbrios intracelulares ou se é um mecanismo de morte celular programada, como mostrado por Huang et al., (2019).

Através dos resultados obtidos com a PCR, foi observado que o tratamento com **PH100** modula a expressão gênica de peptidases. Desta forma, o ensaio de azocaseína foi realizado para verificar se o composto age também estimulando ou inibindo a atividade de peptidases. Os trofozoítos tratados com **PH100** na IC₅₀ por 24 horas apresentaram redução de cerca de 60% da atividade total de peptidases, pois o substrato azocaseína não é específico. Em seguida, a identificação das peptidases moduladas por **PH100** foi analisada através de zimogramas em gel SDS-PAGE copolimerizado com 1% de gelatina. Os resultados mostraram duas regiões de bandas que apresentaram modulação da atividade de peptidases, quando comparados

trofozoítos tratados com controles de ambos isolados. Tanto para ATCC 30236 quando para TV-LACM15 mais claras em regiões de maior peso molecular foram observadas, indicando aumento da atividade dessas peptidases. Porém também foram observadas bandas mais escuras em região de menor peso molecular, significando redução ou inibição da atividade de peptidases. Como visto anteriormente, tanto TvCP2 quanto TvCatD apresentam peso molecular na região de ~30 a ~35 kDa, e a expressão gênica de ambas foi reduzida em ATCC 30236 tratado com **PH100**. Dados mostram que calpaína se encontra em região ~80 kDa. Em ambos isolados houve redução da expressão gênica e no zimograma foi observada região mais clara em ~80 kDa (Carragher, 2006), desta forma podemos sugerir que a atividade de calpaína é reduzida ou inibida pelo tratamento com **PH100**. Correlacionando esse dado com as bandas mais escuras dos zimogramas encontradas nesta mesma região, podemos sugerir que as atividades também são reduzidas ou inibidas por **PH100**. Para confirmação dos resultados obtidos no gel e identificação das peptidases que tem sua atividade modulada pelo tratamento com **PH100**, as bandas que ficaram diferentes dos controles foram recortadas e digeridas e estão em análise através de espectroscopia de massas.

II. Conclusões

Os resultados obtidos nessa dissertação permitem as seguintes conclusões:

1. **PH100** apresentou valores de MIC e bons valores de IC₅₀, principalmente frente ao isolado clínico fresco TV-LACM15, isolado menos suscetível ao MTZ em comparação ao isolado ATCC 30236;
2. O derivado **PH100** apresentou efeito sinérgico com MTZ;
3. O composto mostrou maior seletividade para os trofozoítos do que para as diferentes linhagens celulares mamíferas e eritrócitos humanos;
4. O derivado **PH100** não teve efeito na produção de espécies reativas de oxigênio pelo parasito, demonstrando mecanismo de ação diferente ao do MTZ e envolvido em resistência;
5. Características de morte celular programada foram observadas nos trofozoítos tratados com **PH100** sugerindo morte celular por apoptose-*like*;
6. O composto **PH100** modulou a expressão gênica de enzimas relacionadas à apoptose em outros organismos, entre elas algumas peptidases;
7. A atividade proteolítica de peptidases de *T. vaginalis* foi alterada após tratamento com **PH100**.

III. Perspectivas

A fim de identificar quais peptidases possuem suas atividades moduladas pelo tratamento com **PH100**, esse estudo tem como perspectivas:

1. Testar o efeito do derivado **PH100** em isolados clínicos frescos de *T. vaginalis* com diferentes perfis de endossimbiose de *Trichomonasvirus* (TVV) a fim de investigar a relação entre a atividade do composto e a modulação das peptidases por TVV;
2. Identificação das peptidases que tiveram suas atividades moduladas pelo tratamento com **PH100** através de espectroscopia de massas.
3. Realizar análise proteômica dos isolados de *T. vaginalis* após tratamento com **PH100**.

IV. Referências bibliográficas

- ABUELIZZ, Hatem A. et al. Molecular modeling, enzyme activity, anti-inflammatory and antiarthritic activities of newly synthesized quinazoline derivatives. *Future medicinal chemistry*, v. 9, n. 17, p. 1995-2009, 2017.
- ALI, Vahab; NOZAKI, Tomoyoshi. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasites. *Clinical microbiology reviews*, v. 20, n. 1, p. 164-187, 2007.
- ARROYO, Rossana et al. *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases: iron response in gene expression and proteolytic activity. *BioMed research international*, v. 2015, 2015.
- BACH, Anne-Sophie et al. Nuclear cathepsin D enhances TRPS1 transcriptional repressor function to regulate cell cycle progression and transformation in human breast cancer cells. *Oncotarget*, v. 6, n. 29, p. 28084, 2015.
- BASTIDA-CORCUERA, F. D. et al. Antibodies to *Trichomonas vaginalis* surface glycolipid. *Sexually Transmitted Infections*, v. 89, n. 6, p. 467-472, 2013.
- BAXT, Leigh A. et al. Downregulation of an *Entamoeba histolytica* rhomboid protease reveals roles in regulating parasite adhesion and phagocytosis. *Eukaryotic cell*, v. 9, n. 8, p. 1283-1293, 2010.
- BENCHIMOL, Marlene. Trichomonads under microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, v. 10, n. 5, p. 528-550, 2004.
- BENCHIMOL, Marlene. Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue and Cell*, v. 41, n. 3, p. 151-168, 2009.
- BRADIC, Martina et al. Genetic indicators of drug resistance in the highly repetitive genome of *Trichomonas vaginalis*. *Genome biology and evolution*, v. 9, n. 6, p. 1658-1672, 2017.
- CAO, Shengchuan et al. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via suppressing mitophagy. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2019.
- CARRAGHER, Neil O. Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Current pharmaceutical design*, v. 12, n. 5, p. 615-638, 2006.
- CAVALLO-MEDVED, Dora; MOIN, Kamiar; SLOANE, Bonnie. Cathepsin B: Basis Sequence: Mouse. *The AFCS-nature molecule pages*, v. 2011, 2011.

CHARRAS, G. T. A short history of blebbing. *Journal of microscopy*, v. 231, n. 3, p. 466-478, 2008.

CHERRY, Jonathan J. et al. In vitro and in vivo effects of 2, 4 diaminoquinazoline inhibitors of the decapping scavenger enzyme DcpS: Context-specific modulation of SMN transcript levels. *PloS one*, v. 12, n. 9, p. e0185079, 2017.

CHOSE, Olivier et al. A form of cell death with some features resembling apoptosis in the amitochondrial unicellular organism *Trichomonas vaginalis*. *Experimental cell research*, v. 276, n. 1, p. 32-39, 2002.

CHOSE, OLIVIER et al. Cell death in protists without mitochondria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1010, n. 1, p. 121-125, 2003.

COTCH, Mary Frances et al. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. *Sexually transmitted diseases*, v. 24, n. 6, p. 353-360, 1997.

CUDMORE, Sarah L. et al. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology reviews*, v. 17, n. 4, p. 783-793, 2004.

DA LUZ BECKER, Débora et al. High rates of double-stranded RNA viruses and *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* clinical isolates in South Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 34, p. 181-187, 2015.

DE BRUM VIEIRA, Patricia; TASCA, Tiana; EVAN SECOR, W. Challenges and persistent questions in the treatment of Trichomoniasis. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 17, n. 11, p. 1249-1265, 2017.

DE CASTRO BARBOSA, Maria Letícia et al. Novel 2-chloro-4-anilino-quinazoline derivatives as EGFR and VEGFR-2 dual inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, v. 71, p. 1-14, 2014.

DUNNE, Rebecca L. et al. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell research*, v. 13, n. 4, p. 239, 2003.

DYALL, Sabrina D.; JOHNSON, Patricia J. Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Current opinion in microbiology*, v. 3, n. 4, p. 404-411, 2000.

ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

EL-TOMBARY, Alaa A. et al. Novel triazolo [4, 3-a] quinazolinone and bis-triazolo [4, 3-a: 4, 3'-c] quinazolines: synthesis and antitoxoplasmosis effect. *Il Farmaco*, v. 54, n. 7, p. 486-495, 1999.

FICHOROVA, Raina N. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *Journal of reproductive immunology*, v. 83, n. 1-2, p. 185-189, 2009.

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

FIORI, Pier Luigi et al. Association of *Trichomonas vaginalis* with its symbiont *Mycoplasma hominis* synergistically upregulates the in vitro proinflammatory response of human monocytes. *Sexually Transmitted Infections*, v. 89, n. 6, p. 449-454, 2013.

FLUHRER, Regina. Intramembrane cleaving proteases (I-CLiPs) as guardians of shuttling proteins. *Cell Cycle*, v. 13, n. 5, p. 695-695, 2014.

FRÖHLICH, Tony et al. Synthesis of novel hybrids of quinazoline and artemisinin with high activities against *Plasmodium falciparum*, human cytomegalovirus, and leukemia cells. *ACS omega*, v. 2, n. 6, p. 2422-2431, 2017.

GALLUZZI, Lorenzo et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, v. 25, n. 3, p. 486, 2018.

GARCIA, Ana F. et al. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular microbiology*, v. 47, n. 5, p. 1207-1224, 2003.

GELLIS, Armand et al. Looking for new antiplasmodial quinazolines: DMAP-catalyzed synthesis of 4-benzyloxy-and 4-aryloxy-2-trichloromethylquinazolines and their in vitro evaluation toward *Plasmodium falciparum*. *European journal of medicinal chemistry*, v. 119, p. 34-44, 2016.

GILBERT, R. O. et al. Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 7, p. 4200-4206, 2000.

GIORDANI, Raquel Brandt et al. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry*, v. 72, n. 7, p. 645-650, 2011.

GROGL, M.; HICKMAN, M.; ELLIS, W.; HUDSON, T.; LAZO, J. S.; SHARLOW, E. R.; JOHNSON, J.; BERMAN, J., SCIOTTI, R. J. Drug discovery algorithm for cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 88, n. 2, p. 216-221, 2013.

HERNÁNDEZ-GARCÍA, Mar S. et al. Biogenesis of Autophagosome in *Trichomonas vaginalis* during Macroautophagy Induced by Rapamycin-treatment and Iron or Glucose Starvation Conditions. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2019.

HERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, Rodolfo et al. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental parasitology*, v. 107, n. 3-4, p. 125-135, 2004.

HERNANDEZ-ROMANO, Pablo et al. Identification and characterization of a surface-associated, subtilisin-like serine protease in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*, v. 137, n. 11, p. 1621-1635, 2010.

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

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

HUANG, Kuo-Yang et al. Potential role of autophagy in proteolysis in *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 52, n. 2, p. 336-344, 2019.

ISHIHARA, Naotada et al. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *The EMBO journal*, v. 25, n. 13, p. 2966-2977, 2006.

KABRI, Youssef et al. Original quinazoline derivatives displaying antiplasmodial properties. *European journal of medicinal chemistry*, v. 45, n. 2, p. 616-622, 2010.

KANT, Sashi et al. A novel STK1-targeted small-molecule as an “antibiotic resistance breaker” against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 5067, 2017.

KHOSHMAN, Ali; ALDERETE, J. F. Characterization of double-stranded RNA satellites associated with the *Trichomonas vaginalis* virus. *Journal of virology*, v. 69, n. 11, p. 6892-6897, 1995.

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

KULDA, Jaroslav. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International journal for parasitology*, v. 29, n. 2, p. 199-212, 1999.

LAGA, Marie et al. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS (London, England)*, v. 7, n. 1, p. 95-102, 1993.

LAND, Kirkwood M.; CLEMENS, Daniel L.; JOHNSON, Patricia J. Loss of multiple hydrogenosomal proteins associated with organelle metabolism and high-level drug resistance in trichomonads. *Experimental parasitology*, v. 97, n. 2, p. 102-110, 2001.

LAZENBY, Gweneth B. et al. An association between *Trichomonas vaginalis* and high-risk human papillomavirus in rural Tanzanian women undergoing cervical cancer screening. *Clinical therapeutics*, v. 36, n. 1, p. 38-45, 2014.

LAZENBY, Gweneth B.; SOPER, David E.; NOLTE, Frederick S. Correlation of leukorrhea and *Trichomonas vaginalis* infection. *Journal of clinical microbiology*, v. 51, n. 7, p. 2323-2327, 2013.

LEHKER, Michael W.; SWEENEY, Daniel. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sexually Transmitted Infections*, v. 75, n. 4, p. 231-238, 1999.

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

LEITSCH, David et al. Down-regulation of flavin reductase and alcohol dehydrogenase-1 (ADH1) in metronidazole-resistant isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 183, n. 2, p. 177-183, 2012.

LEITSCH, David et al. *Trichomonas vaginalis* flavin reductase 1 and its role in metronidazole resistance. *Molecular microbiology*, v. 91, n. 1, p. 198-208, 2014.

LEITSCH, David et al. *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular

redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Molecular microbiology*, v. 72, n. 2, p. 518-536, 2009.

LEITSCH, David; WILLIAMS, Catrin F.; HRDÝ, Ivan. Redox pathways as drug targets in microaerophilic parasites. *Trends in parasitology*, v. 34, n. 7, p. 576-589, 2018.

LI, Zeng et al. 2-(2-indolyl)-4 (3 H)-quinazolines derivatives as new inhibitors of AChE: design, synthesis, biological evaluation and molecular modelling. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, v. 28, n. 3, p. 583-592, 2013.

LIU, Zexian et al. Precise prediction of calpain cleavage sites and their aberrance caused by mutations in cancer. *Frontiers in genetics*, v. 10, p. 715, 2019.

MA, Lina et al. Involvement of the GP63 protease in infection of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology research*, v. 109, n. 1, p. 71-79, 2011.

MEIJER, Alfred J.; CODOGNO, Patrice. Autophagy: regulation and role in disease. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, v. 46, n. 4, p. 210-240, 2009.

MENDOZA-MARTÍNEZ, César et al. Design, synthesis and biological evaluation of quinazoline derivatives as anti-trypanosomatid and anti-plasmodial agents. *European journal of medicinal chemistry*, v. 96, p. 296-307, 2015.

MENEZES, Camila Braz; FRASSON, Amanda Piccoli; TASCA, Tiana. Trichomoniasis- are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide?. *Microbial cell*, v. 3, n. 9, p. 404, 2016.

MERCER, Frances et al. Neutrophils kill the parasite *Trichomonas vaginalis* using trogocytosis. *PLoS biology*, v. 16, n. 2, p. e2003885, 2018.

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

MILLER, Megan R.; NYIRJESY, Paul. Refractory trichomoniasis in HIV-positive and HIV-negative subjects. *Current infectious disease reports*, v. 13, n. 6, p. 595, 2011.

MIRANDA-OZUNA, Jesús FT et al. Glucose-restriction increases *Trichomonas vaginalis* cellular damage towards HeLa cells and proteolytic activity of cysteine proteinases (CPs), such as TvCP2. *Parasitology*, p. 1-11, 2019.

Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Disponível: www.saude.gov.br. Acesso janeiro de 2019.

MOHAMMADI-BERENJESTANAKI, Hamideh et al. In Vitro Synergistic Effect of Vancomycin and Some Antibacterial Agents Against Clinical Methicillin-Resistant and Sensitive *Staphylococcus aureus* Isolates. *Microbial Drug Resistance*, 2019.

NAVA-ZUAZO, C.; ESTRADA-SOTO, S.; GUERRERO-ALVAREZ, J.; LEÓN-RIVERA, I.; MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S.; CHAN-BACAB, M. J.; CEDILLO-RIVERA, R.; MOO-PUC, R.; MIRÓN-LÓPEZ, G.; NAVARRETEVAZQUEZ, G. Design, synthesis, and in vitro antiprotozoal, antimycobacterial activities of N-{2-[(7-chloroquinolin-4-yl) amino] ethyl}ureas. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 18, n. 17, p. 6398-6403, 2010.

NEDELSKY, Natalia B.; TODD, Peter K.; TAYLOR, J. Paul. Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1782, n. 12, p. 691-699, 2008.

NIEVAS, Yesica R. et al. Protein palmitoylation plays an important role in *Trichomonas vaginalis* adherence. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 17, n. 11, p. 2229-2241, 2018.

OHSUMI, Yoshinori. Ubiquitin and proteasomes: Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 2, n. 3, p. 211, 2001.

OWUSU-EDUSEI JR, Kwame et al. The estimated direct medical cost of selected sexually transmitted infections in the United States, 2008. *Sexually transmitted diseases*, v. 40, n. 3, p. 197-201, 2013.

OZCELIK, S. et al. The cytopathic effects of *Trichomonas vaginalis* on fibroblast cell culture alone and with *C. albicans* and *E. coli*. *Turkiye parazitolojii dergisi*, v. 36, n. 4, p. 193-197, 2012.

PAL, Chinmay; BANDYOPADHYAY, Uday. Redox-active antiparasitic drugs. *Antioxidants & redox signaling*, v. 17, n. 4, p. 555-582, 2012.

PEARLMAN, Mark D. et al. An incremental dosing protocol for women with severe vaginal trichomoniasis and adverse reactions to metronidazole. *American journal of obstetrics and gynecology*, v. 174, n. 3, p. 934-936, 1996.

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

PETRIN, Dino et al. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology reviews*, v. 11, n. 2, p. 300-317, 1998.

POOLE, Danielle N.; MCCLELLAND, R. Scott. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sex Transm Infect*, v. 89, n. 6, p. 418-422, 2013.

PROVENZANO, Daniele; ALDERETE, J. F. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, v. 63, n. 9, p. 3388-3395, 1995.

QUINTAS-GRANADOS, Laura Itzel et al. TvMP50 is an immunogenic metalloproteinase during male trichomoniasis. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 12, n. 7, p. 1953-1964, 2013.

QUON, D.-V.; D'OLIVEIRA, Christine E.; JOHNSON, Patricia J. Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, n. 10, p. 4402-4406, 1992.

RAVEZ, Severine et al. Quinazoline derivatives as anticancer drugs: a patent review (2011–present). *Expert opinion on therapeutic patents*, v. 25, n. 7, p. 789-804, 2015.

RENDÓN-GANDARILLA, Francisco Javier et al. The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *BioMed research international*, v. 2013, 2013.

RIESTRA, Angelica M. et al. A *Trichomonas vaginalis* rhomboid protease and its substrate modulate parasite attachment and cytolysis of host cells. *PLoS pathogens*, v. 11, n. 12, p. e1005294, 2015.

ROBINSON, S. C. Trichomonal vaginitis resistant to metranidazole. *Canadian Medical Association Journal*, v. 86, n. 14, p. 665, 1962.

ROWLEY, Jane et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 97, n. 8, p. 548, 2019.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, Diana Belén et al. Characterization of a novel endogenous cysteine proteinase inhibitor, trichocystatin-3 (TC-3), localized on the surface of

Trichomonas vaginalis. The international journal of biochemistry & cell biology, v. 102, p. 87-100, 2018.

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

SECOR, W. Evan et al. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 90, n. 5, p. 800-804, 2014.

SILVER, Bronwyn J. et al. *Trichomonas vaginalis* as a cause of perinatal morbidity: a systematic review and meta-analysis. Sexually transmitted diseases, v. 41, n. 6, p. 369-376, 2014.

SORVILLO, Frank et al. Risk factors for trichomoniasis among women with human immunodeficiency virus (HIV) infection at a public clinic in Los Angeles County, California: implications for HIV prevention. The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 58, n. 4, p. 495-500, 1998.

SPERANDIO, Sabina; DE BELLE, Ian; BREDESEN, Dale E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 97, n. 26, p. 14376-14381, 2000.

SUTCLIFFE, Siobhan. Sexually transmitted infections and risk of prostate cancer: review of historical and emerging hypotheses. Future oncology, v. 6, n. 8, p. 1289-1311, 2010.

TANG, Bikui et al. Antimicrobial Activity of Quinazolin Derivatives of 1, 2-Di (quinazolin-4-yl) diselane against Mycobacteria. BioMed research international, v. 2017, 2017.

TWU, Olivia et al. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host: parasite interactions. PLoS pathogens, v. 9, n. 7, p. e1003482, 2013.

VAN HORN, Kurt S. et al. Antileishmanial activity of a series of N 2, N 4-disubstituted quinazoline-2, 4-diamines. Journal of medicinal chemistry, v. 57, n. 12, p. 5141-5156, 2014.

YADAV, M.; GUPTA, I.; MALLA, N. Kinetics of immunoglobulin G, M, A and IgG subclass responses in experimental intravaginal trichomoniasis: prominence of IgG1 response. Parasite immunology, v. 27, n. 12, p. 461-467, 2005.

WORKOWSKI, Kimberly A.; BERMAN, Stuart M. Centers for Disease Control and Prevention sexually transmitted disease treatment guidelines. *Clinical infectious diseases*, v. 53, n. suppl_3, p. S59-S63, 2011.

ZAYED, Mohamed et al. Synthesis, modelling, and anticonvulsant studies of new quinazolines showing three highly active compounds with low toxicity and high affinity to the GABA-A receptor. *Molecules*, v. 22, n. 2, p. 188, 2017.

ZENG, Mei et al. Potent and selective covalent quinazoline inhibitors of KRAS G12C. *Cell chemical biology*, v. 24, n. 8, p. 1005-1016. e3, 2017.