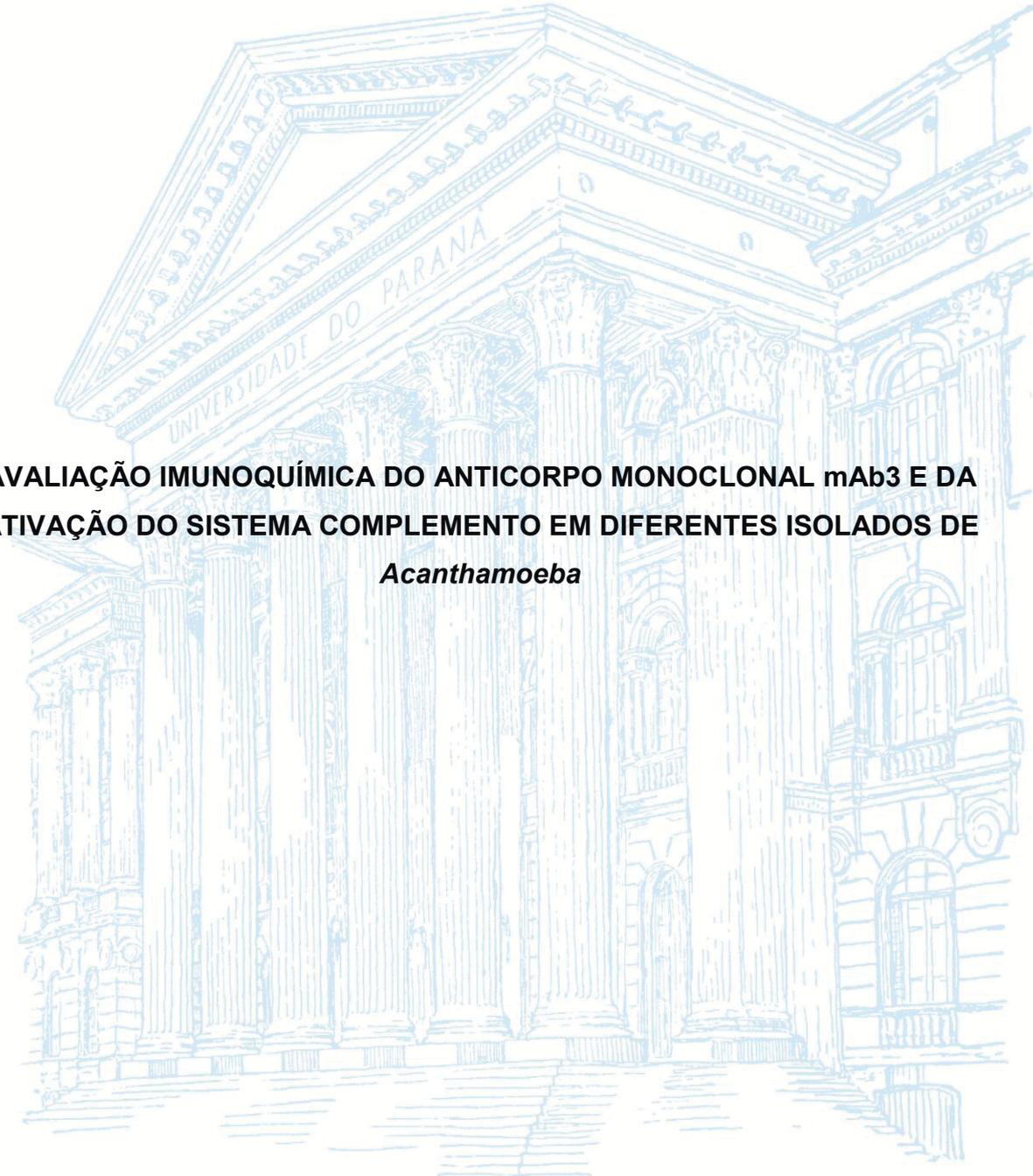


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELE MARTHA WEBER LIMA



**AVALIAÇÃO IMUNOQUÍMICA DO ANTICORPO MONOCLONAL mAb3 E DA
ATIVÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO EM DIFERENTES ISOLADOS DE
*Acanthamoeba***

CURITIBA
2017

MICHELE MARTHA WEBER LIMA

**AVALIAÇÃO IMUNOQUÍMICA DO ANTICORPO MONOCLONAL mAb3 E DA
ATIVÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO EM DIFERENTES ISOLADOS DE
*Acanthamoeba***

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Larissa Magalhães Alvarenga

Co-orientadores: Prof^a. Dr^a Adriana Oliveira Costa, Prof^a. Dr^a. Juliana Ferreira de Moura e Prof^o. Dr^o. Marcel Ramirez

CURITIBA
2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Lima, Michele Martha Weber

Avaliação imunológica do anticorpo monoclonal mAb3 e da ativação do sistema complemento em diferentes isolados de *Acanthamoeba*. / Michele Martha Weber Lima. – Curitiba, 2017.

72 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Larissa Magalhães Alvarenga

Co-orientadora: Adriana Oliveira Costa

Co-orientadora: Juliana Ferreira de Moura

Co-orientador: Marcel Ramirez

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. *Acanthamoeba*. 2. Citometria de fluxo. 3. Anticorpos monoclonais. Título II. Alvarenga, Larissa Magalhães. III. Costa, Adriana Oliveira. IV. Moura, Juliana Ferreira de. V. Ramirez, Marcel. VI. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 616.01



Ministério de Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

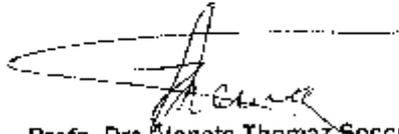
**“Avaliação imunológica e da ativação do sistema
complemento em diferentes isolados de *Acanthamoeba*”**

por

Michele Martha Weber Lima

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia
e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**


Prof. Dra. Larissa Magalhães Alvaranga – Presidente


Prof. Dra. Vanete Thomaz Soccol


Prof. Dra. Ingrid Solange Evans Osses

Curitiba, 01 de setembro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me permitir estudar e fornecer todos os dias a sabedoria mínima para que conseguisse dar continuidade ao que foi me concedido e pela presença constante em minha vida.

Agradeço também a minha família, ao meu pai José Eugenio Camargo Lima, a minha mãe Medili Cristina Weber Lima, aos meus irmãos Katianne Cristina Weber Lima e Odilon Miguel Weber Lima e ao meu namorado Lyan Carlo do Rosário por todo companheirismo, carinho e paciência.

A Prof^a. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga, por confiar no meu trabalho e me proporcionar todas as condições para desenvolver a pesquisa.

Aos coorientadores Prof^a. Dra. Adriana Oliveira Costa e Prof^o. Dr. Marcel Ramirez pela orientação, dedicação, confiança e por todas as oportunidades fornecidas.

A Dra. Alessandra Becker Finco por toda atenção, orientação, tempo dedicado, ensinamento, discussões e parceria, permitindo sempre o meu próprio crescimento.

A Prof^a. Dra. Juliana Ferreira de Moura e o Prof^o. Dr. Phillippe Billiald pela contribuição para minha formação e pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa.

Aos meus companheiros de laboratório: Carla Yoko Tanikawa de Andrade, Isabel Biasi Yamanaka, Guillermo Andres Cerquera, Rafaela Lenzi Fogaça, Sabrina Karin Silva, Angie Becerra Moncada, Fábio Gaio Chimentão, Juliana Santana e Camila Mondini pela amizade, trabalho em equipe e ajudas imprescindíveis para realização desse trabalho.

Ao Instituto Carlos Chagas – Fio Cruz/Paraná, pela possibilidade de análise das amostras por espectrometria de massas e ao Michel Batista por realizar as análises.

A banca avaliadora Prof^a. Dra. Vanete Thomaz Soccol e Dra. Ingrid Solange Evans Osses pelas valiosas sugestões.

Ao Programa de Pós-graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia e aos professores docentes que fizeram parte da minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

A cada dia percebo que nada foi por acaso e tudo que me foi permitido teve um porque, mesmo que momentaneamente não fosse compreendido. Acredito que as nossas lutas e aflições vêm para nos ensinar a andar. Muitas vezes elas não poderão ser visualizadas e reconhecidas, porém Deus conhece a sua luta e hoje é isso que me satisfaz.

RESUMO

O aumento da ocorrência de casos clínicos de ceratite amebiana (CA), grave infecção da córnea causada por amebas do gênero *Acanthamoeba*, tem levado a um crescente número de estudos sobre esse microrganismo. As amebas desse gênero são protozoários de vida livre, encontrados em diversos ambientes como ar, solo e água e são denominados anfizóicos, por sua capacidade de viver livremente no ambiente e de facultativamente causar infecções em animais e no ser humano. Atualmente, são admitidos diferentes genótipos de *Acanthamoeba* e alguns estudos demonstram relação entre o potencial de infecção e patogenicidade. Porém, fatores associados ao hospedeiro, como a interação do protozoário com o sistema imune, também tem sido avaliados como possível explicação para a ocorrência das infecções. Outra lacuna importante no conhecimento sobre as infecções por *Acanthamoeba* é a dificuldade no diagnóstico devido à similaridade com outras doenças, resultando em condutas clínicas inadequadas que agravam os casos. Recentemente nosso grupo produziu um anticorpo monoclonal, denominado mAb3, que apresentou reatividade por uma proteína que pode estar associada com potencial patogênico. O objetivo deste estudo é caracterizar os antígenos reconhecidos pelo mAb3, avaliar a importância desse antígeno no mecanismo de patogenicidade da CA e empregar este anticorpo na detecção de *Acanthamoeba*. No presente trabalho a reatividade do mAb3 foi avaliada por *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), eletroforese SDS-PAGE, *Western blotting* e citometria de fluxo. Foi observado diferenças na expressão do antígeno alvo para diferentes isolados. Outros agentes também causadores de ceratite foram testados e não foram reconhecidos, confirmando a especificidade do mAb3. Foi possível identificar uma pequena quantidade de amostra de trofozoítos por citometria de fluxo, demonstrando uma alta reatividade do anticorpo. Dessa forma, seria possível melhorar a sensibilidade e tempo dos testes atualmente empregados para identificação de isolados com o uso deste anticorpo. O reconhecimento pelo mAb3 é influenciado pela inibição de N-glicosilações. A identificação da proteína alvo por espectrometria de massas sugeriu ser uma proteína transportadora de membrana da família CPA2. Foram observadas diferenças em relação à lise mediada pelo sistema complemento nos isolados analisados. Dois deles (AP2 e R2P5), com variações no reconhecimento pelo mAb3, foram avaliados quanto à capacidade de ativar diferentes vias do complemento, sendo que R2P5 apresentou maior tempo de sobrevivência, após a exposição ao soro normal humano. A via alternativa foi mais ativa quando as vias da Lectina e Clássica foram inibidas, sugerindo que na presença das três vias poderia existir algum efeito inibidor da via alternativa. Porém, mais estudos envolvendo a ação biológica dessa proteína, precisam ser investigadas para elucidar os mecanismos de reconhecimento do mAb3 e resistência da ativação do sistema complemento, as quais podem estar associadas a infectividade das *Acanthamoeba* na CA.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*. Citometria de fluxo. Anticorpo monoclonal. Sistema Complemento.

ABSTRACT

Increased occurrence of clinical cases of amebic keratitis (CA), a severe corneal infection caused by amoebas of the genus *Acanthamoeba*, has led to a growing number of studies on this microorganism. Amoebas of this genus are free-living protozoa, found in several environments such as air, soil and water and are called amphizóicos, for their ability to live freely in the environment and to cause infections in animals and in humans at will. Different *Acanthamoeba* genotypes are currently recognized and some studies show differences between potential for infection and pathogenicity. However, factors related to the host, such as the interaction of the protozoan with the immune system, have also been evaluated as a possible explanation for the occurrence of infections. Another important difficulty related to *Acanthamoeba* infections is mis-diagnosis due to its similarity with other diseases, resulting in inadequate clinical procedures that may aggravate the infection. Recently our group produced a monoclonal antibody, called mAb3, that recognizes antigens present in pathogenic strains. The aim of this study is to characterize the antigens recognized by mAb3, to evaluate the importance of this antigen in the mechanism of CA pathogenicity and to use this antibody in the detection of *Acanthamoeba*. In the present work, the reactivity of mAb3 was evaluated by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), electrophoresis SDS-PAGE, Western blotting and flow cytometry. The mAb3 antibody, already described in previous studies, showed reactivity to a protein that may be associated with pathogenic potential. Differences in the expression of the target antigen were observed for different isolates. Other agents also causing keratitis were tested and were not recognized, conforming to the specificity of mAb3. It was possible to identify a small amount of trophozoite sample by mAb3 by flow cytometry, demonstrating a high antibody reactivity. Using this antibody, it would be possible to improve the sensitivity and reduce the time currently needed to identify isolates. Recognition by mAb3 is influenced by the inhibition of N-glycosylations. Identification of the protein by mass spectrometry suggested it to be a membrane carrier of the CPA2 family. Differences were observed in relation to lysis mediated by the complement system in the isolates analyzed. Two of them (AP2 and R2P5), with variations in recognition by mAb3, were evaluated for the ability to activate different complement pathways, and R2P5 presented more resistance to death after exposure to normal human serum. The alternative pathway was more active when the Lectin and Classical pathways were inhibited, suggesting that in the presence of the three pathways there could be some inhibitory effect of the alternative pathway. However, further studies involving the biological action of this protein are needed to investigate and to elucidate the mechanisms of mAb3 recognition and resistance of complement system activation, which may be associated with the infectivity of *Acanthamoeba* in CA.

Key-words: *Acanthamoeba*. Flow cytometry. Monoclonal antibody. Complement system.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	FORMAS EVOLUTIVAS DO CICLO DE VIDA DE <i>Acanthamoeba</i>	18
FIGURA 2:	MECANISMO DE INFECÇÃO POR <i>Acanthamoeba</i> NA CERATITE AMEBIANA.	22
FIGURA 3:	FLUXOGRAMA GERAL DE TRABALHO	27
FIGURA 4:	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ALVO DO mAb3 POR IMUNOPRECIPITAÇÃO	34
FIGURA 5:	PERFIL ELETROFORÉTICO DO ANTICORPO (mAb3)	36
FIGURA 6:	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DEMONSTRANDO A AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO VARIÁVEL DE CADEIA LEVE (VL) E PESADA (VH)	36
FIGURA 7:	SEQUÊNCIAS DOS FRAGMENTOS DE CADEIA PESADA E LEVE DO ANTICORPO mAb3	37
FIGURA 8:	REATIVIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL CONTRA ANTÍGENOS DE <i>Acanthamoeba</i> VIZUALIZADA POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	40
FIGURA 9:	REATIVIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL CONTRA ANTÍGENOS DE <i>Acanthamoeba</i> E FUNGOS POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	41
FIGURA 10:	HISTOGRAMA EVIDENCIANDO A REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE A DIFERENTES ISOLADOS DE <i>Acanthamoeba</i> sp. POR CITOMETRIA DE FLUXO	43
FIGURA 11:	HISTOGRAMA DA QUANTIDADE MÍNIMA DE TROFOZOÍTOS FRENTE AO mAb3, AVALIADO POR CITOMETRIA DE FLUXO	45
FIGURA 12:	HISTOGRAMA DEMONSTRANDO A INFLUÊNCIA DA TUNICAMICINA EM RELAÇÃO AO RECONHECIMENTO DO mAb3 POR CITOMETRIA DE FLUXO	48
FIGURA 13:	REATIVIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL CONTRA ANTÍGENOS PURIFICADOS DE <i>Acanthamoeba</i> sp., POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	49
FIGURA 14:	FIGURA REPRESENTATIVA DA PROTEÍNA DE MEMBRANA TRANSPORTADORA DE CÁTION MONOVALENTE (CPA2, <i>ANTIPORTER</i>)	51

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1: ELISA DE REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE AOS ISOLADOS PATOGÊNICO (AP2) E NÃO PATOGÊNICO (AP4) 38
- GRÁFICO 2: ELISA DE REATIVIDADE DO mAb3 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FRENTE AOS ISOLADOS PATOGÊNICO (AP2) E NÃO PATOGÊNICO (AP4) 38
- GRÁFICO 3: ELISA DE REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE AOS ISOLADOS PATOGÊNICOS E NÃO PATOGÊNICOS DE *Acanthamoeba* E FUNGOS 39
- GRÁFICO 4: CINÉTICA DE CRESCIMENTO DOS DIFERENTES ISOLADOS DE *Acanthamoeba* 53
- GRÁFICO 5: LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO EM DIFERENTES ISOLADOS DE *Acanthamoeba* sp. 53
- GRÁFICO 6: ANÁLISE DA LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO DE DIFERENTES ISOLADOS DE *Acanthamoeba* sp. 54
- GRÁFICO 7: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA TUNICAMICINA NA ATIVAÇÃO COMPLEMENTO 55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	CEPAS E ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE <i>Acanthamoeba</i>	28
TABELA 2:	MÉDIA DA REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE A DIFERENTES ISOLADOS, POR CITOMETRIA DE FLUXO	45
TABELA 3:	MÉDIA DA REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE A DIFERENTES QUANTIDADES DE CÉLULAS, POR CITOMETRIA DE FLUXO	46
TABELA 4:	INFLUÊNCIA DA TUNICAMICINA PELO RECONHECIMENTO DO mAb3	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVL	Amebas de vida livre
CA	Ceratite amebiana
cDNA	DNA complementar
DAP	Diaminobenzidina
DMP	Dimetilpimelimidato
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	<i>Ditiotreitol</i>
EAG	Encefalite amebiana granulomatosa
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FITC	<i>Isotiocianato de fluoresceína-conjugated</i>
GSH	<i>Glutathione</i>
GS-X	<i>Glutathione-S-conjugates</i>
Kef	<i>Potassium efflux system</i>
Limq	Laboratório de Imunoquímica
mAb	Anticorpo monoclonal
MBL	Proteína ligadora de manose (<i>mannose binding protein</i>)
MS	Espectrometria de massa
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBS-T	<i>PBS-Tween</i>
OPD	Ortofenilenodiamino
PYG	Meio de cultura proteose – peptona extrato de levedo (<i>yeast extract-Page's amoeba saline</i>)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PS	<i>Penicilina e streptomycin</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SC	Sistema complemento
SFB	Soro fetal bovino
SNH	Soro normal humano
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

- VL** Fragmento variável de cadeia leve
- VH** Fragmento variável de cadeia pesada
- VR** Volume da resina
- UFMG** Universidade Federal de Minas Gerais
- UFPR** Universidade Federal do Paraná
- UFRJ** Universidade Federal do Rio de Janeiro
- WB** *Western blotting*

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alpha
©	Copyright
xg	Força gravitacional
g	Grama
°C	Graus Celsius
h	Hora
Kb	Kilobase
λ	Lamda
®	Marca registrada
μg	Micrograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mm	Milimol
min	Minuto
x	Multiplicação
nm	Nanômetros
pb	Par de bases
%	Porcentagem
rpm	Rotações por minuto
#	antífen

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 <i>Acanthamoeba</i> - CICLO DE VIDA CLASSIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIA.....	18
2.2 CERATITE POR <i>Acanthamoeba</i>	20
2.3 RESPOSTA IMUNE	23
2.4 ESTUDO PROTEICO DE ISOLADOS DE <i>Acanthamoeba</i>	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 PRODUÇÃO DOS ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE <i>Acanthamoeba</i>	27
4.1.1 Culturas de <i>Acanthamoeba</i>	27
4.1.2 Produção de Antígenos	29
4.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MONOCLONAL	29
4.2.1 Amplificação dos hibridomas e purificação dos anticorpos monoclonais anti- <i>Acanthamoeba</i>	29
4.2.2 Sequenciamento gênico das regiões variáveis de cadeia leve e pesada do mAb3	29
4.2.3 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	30
4.2.4 Eletroforese SDS-PAGE	31
4.2.5 <i>Western blotting</i>	31
4.2.6 Citometria de fluxo.....	32
4.2.7 Imunoprecipitação da proteína alvo do mAb3 e análise por espectrometria de massa (MS)	32
4.3 ATIVAÇÃO DO SISTEMA DO COMPLEMENTO EM DIFERENTES ISOLADOS DE <i>Acanthamoeba</i> sp.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

5.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL	35
5.1.1 Purificação e caracterização bioquímica do mAb3	35
5.1.2 Sequência genica das regiões variáveis de cadeia leve pesada do mAb3	36
5.1.3 Reatividade do mAb3 frente a antígenos de diferentes isolados de <i>Acanthamoeba</i> por ELISA e <i>Western blotting</i>	37
5.1.4 Reconhecimento de diferentes isolados de <i>Acanthamoeba</i> por Citometria de fluxo	43
5.1.5 Purificação do alvo do mAb3 por imunoprecipitação e análise por espectrometria de massa (MS)	49
5.2 ENSAIO DE LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO	52
6 CONCLUSÕES	58
7 PERSPECTIVAS	60
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1 INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) do gênero *Acanthamoeba* são protozoários encontrados em vários ambientes e com distribuição mundial (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; VISVESVARA et al., 2007). São potencialmente patogênicas, podendo causar infecções em humanos e animais, como a encefalite amebiana granulomatosa (EAG) e a ceratite amebiana (CA) (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; FREDERICK et al., 2004, VISVESVARA et al., 2007). A EAG é uma infecção do encéfalo bastante rara, com cerca de 150 casos humanos reportados mundialmente (TRABELSI et al., 2012). A CA, por outro lado, tem sido diagnosticada com frequência crescente durante as últimas décadas, inclusive com descrição de surtos, que estão associados principalmente ao uso de lentes contato (YODER et al., 2012; JASIM et al., 2012, ARMSTRONG, 2000).

O diagnóstico da CA tem sido geralmente realizado por identificação do agente, em meio de cultura de material raspados da córnea. Nas fases iniciais, a CA é muitas vezes confundida com outras infecções como as fúngicas e as virais o que leva ao tratamento tardio e aumenta as chances de sequelas oculares (ALVARENGA et al., 2000; LORENZO-MORALES et al., 2015). As técnicas moleculares de detecção de DNA são oferecidas como alternativa diagnóstica, mas nem sempre são acessíveis em todos os centros de diagnóstico (WALOCHNIK et al., 2000 b; KHAN et al., 2003, COSTA et al., 2017). Costa et al. (2017) avaliaram um método de extração de DNA que foi eficiente para detectar um trofozoíto e um cisto por snPCR em amostras de córnea de animais e de humanos. No entanto, existem ainda algumas limitações das técnicas moleculares devido ao baixo número de amebas encontradas nas raspagens da córnea e a maior resistência dos cistos à extração e liberação de DNA que devem ser considerados no estabelecimento de um protocolo usando técnicas moleculares.

Nesse sentido, abordagens com outros princípios de detecção para o diagnóstico de *Acanthamoeba* como a utilização de métodos imunológicos são promissores para identificação específica dos agentes patogênicos no sítio de infecção.

Adicionalmente, o emprego de anticorpos pode auxiliar no entendimento da imunopatogenia da infecção, na medida em que podem ser testados em ensaios para avaliar a importância de antígenos específicos alvo na invasão do parasito.

Em 2012, Becker-Finco e colaboradores, descreveram a produção de anticorpos policlonais e 10 anticorpos monoclonais murinos específicos para proteínas presentes em *Acanthamoeba*. Um desses anticorpos, denominado mAb3, foi capaz de identificar 3 isolados com potencial patogênico e não reconheceu antígenos de isolado sem patogenicidade, demonstrando assim sua capacidade de diferenciação entre isolados de *Acanthamoeba*. Desde então, procura-se determinar o alvo do mAb3, que na época estimava-se ser uma proteína ligadora de manose devido a sua massa molecular de 130 kDa e sua relação com a patogenicidade. Neste estudo pretende-se confirmar e caracterizar este antígeno de interesse, em distintos isolados de *Acanthamoeba* e verificar a capacidade mínima do mAb3 em reconhecê-los.

Considerando que a patogenicidade de *Acanthamoeba* pode estar associada com a resistência ao sistema imune inato do hospedeiro, sendo a ativação do sistema complemento (SC) uma importante defesa contra esses agentes, esses isolados foram avaliados quanto à sua resistência ao SC na presença ou não do mAb3.

Desta maneira, a avaliação da expressão proteica, estudo antigênico e resistência ao sistema do complemento podem fornecer informações importantes sobre o mecanismo de patogenicidade destes microrganismos como também sugerir novas abordagens diagnósticas e terapêuticas mais específicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Acanthamoeba* - CICLO DE VIDA, CLASSIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIA

O gênero *Acanthamoeba* é um dos principais grupos pertencentes às AVL potencialmente patogênicas ao ser humano, são cosmopolitas e encontradas em ambientes diversos como solo, água e ar (CLARKE; NIEDERKORN, 2006). Existem registros de *Acanthamoeba* encontradas em todos os ambientes inclusive na presença da água potável como relatado por Yousulf e colaboradores (2017) e na poeira de ambientes hospitalares como mencionado por Costa et al. (2010).

As *Acanthamoeba* apresentam duas formas evolutivas durante o ciclo de vida: uma fase trofozoítica, em condições favoráveis, onde esta se alimenta e se reproduz e uma fase cística, resistente, observada em condições desfavoráveis de sobrevivência (FIGURA 1) (AKSOZEK et al., 2002; FREDERICK et al., 2004; KHAN, 2009).

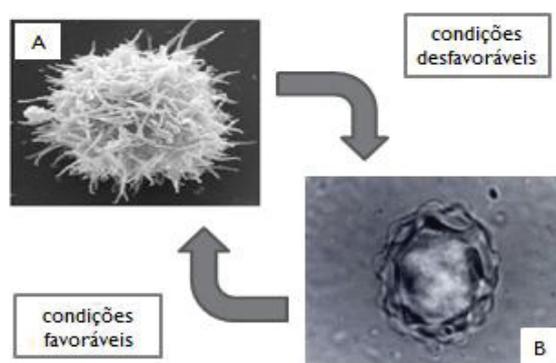


FIGURA 1. FORMAS EVOLUTIVAS DO CICLO DE VIDA DE *Acanthamoeba*. A forma infectante de *Acanthamoeba* conhecida como (a) trofozoíto, é a forma ativa do microrganismo, o ambiente deve ser propício para o seu desenvolvimento e multiplicação. Já em condições desfavoráveis como extremos de pH, salinidade, temperatura e falta de alimento, transforma-se em (b) cisto, forma resistente e latente. **Fonte:** Adaptado de Khan (2003).

As principais espécies de *Acanthamoeba* causadoras de doenças são: *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes*, *A. astronyxis*, *A. divionensis*, *A. lugdunensis*, *A. quina* e *A. griffini* (VISVESVARA et al., 2007; LORENZO-MORALES et al., 2015). Há décadas atrás, a identificação em nível de espécie era tradicionalmente realizada por critérios morfológicos dos cistos (PUSSA; PONS, 1977). Porém este método de identificação pode ser duvidoso, pois de acordo com as características do

meio, como também o repique prolongado destas cepas, podem ocorrer alterações na morfologia dos cistos ao longo do tempo. Além disso, observa-se que diferentes espécies apresentam características similares entre seus cistos e que, em cultivos monoclonais, aparecem cistos de diversas formas (STRAFORD; GRIFFITHS, 1978; VISVEVARA, 1991; CARNT; STAPLETON, 2016).

Para facilitar a classificação de *Acanthamoeba*, Pussard e Pons (1977) propuseram três grupos distintos, de acordo com a morfologia e tamanho dos cistos. O Grupo I é composto por espécies que são caracterizadas por grandes amebas com cistos maiores que 18 µm, ectocisto liso e endocisto geralmente estrelado. O Grupo II inclui, o maior número de espécies, consistindo amebas com cistos medindo cerca de 18 µm, ectocisto ondulado ou rugoso, o contorno do endocisto pode ser ovalado, levemente estrelado ou poliédrico e o Grupo III consiste em espécies com cistos de 18 ou menos micrometros, cistos com ectocisto liso ou levemente rugoso e com endocisto ovalado (PAGE, 1967; PUSSARD; PONS, 1977).

Atualmente, a abordagem mais utilizada para classificar isolados de *Acanthamoeba* é o sequenciamento de genes do rRNA 18S, que permite inclusive determinar a filogenia das espécies. Com base nas diferenças de sequência 15 genótipos (T1-T15) de *Acanthamoeba* foram estabelecidos em 1998 por Stothard. São descritos atualmente 20 genótipos (T1 a T20) (CORSARO et al., 2015). A maioria das cepas que apresentam potencial patogênico pertence ao genótipo T4 (WALOCHNIK et al., 2000 a, MACIVER et al., 2013; DERDA et al., 2015).

Normalmente, *Acanthamoeba* é um organismo inócuo, porém, podem atuar como parasitas oportunistas de seres humanos, sendo que a ocorrência da infecção no homem é completamente acidental (CLARKE; NIEDERKORN, 2006). Anticorpos anti-*Acanthamoeba* podem ser encontrados em soro de seres humanos e em alguns animais, possivelmente devido ao intenso contato com estas populações, sugerindo que a colonização por este gênero possam ser habituais e controladas em hospedeiros imunocompetentes (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; ARMSTRONG, 2000).

As principais doenças causadas ao homem são a encefalite amebiana granulomatosa e ceratite amebiana ou ceratite por *Acanthamoeba*. A EAG é

uma infecção de curso crônico com duração de semanas a anos, sendo adquirida por aspiração e conseqüente colonização do pulmão, ou ainda por lesões cutâneas (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). As amebas depois se disseminam por via hematogênica e atingem o encéfalo, resultando em óbito do paciente na maior parte dos casos (TRABELSI et al., 2012) A EAG ocorre principalmente em imunocomprometidos, o que demonstra o caráter oportunista da infecção (VISVESVARA et al., 2007). É considerada uma infecção muito rara, porém sua letalidade alta tem sido motivo de grande preocupação, taxa de mortalidade maior que 90% (MACIVER et al., 2013; LORENZO-MORALES et al., 2015).

Já a CA é uma infecção que afeta indivíduos sem sinais de imunodepressão, é decorre da lesão e contaminação da córnea por amebas, podendo levar a perda da acuidade visual e até a cegueira (STAPLERON et al., 2009). Por ser uma causa potencial de cegueira, ser de diagnóstico complexo e intenso, a CA tem chamado a atenção de clínicos e pesquisadores, com crescente número de trabalhos nos últimos anos (SIDDIQUI; KHAN, 2012).

Outro aspecto importante do gênero *Acanthamoeba* é sua capacidade de atuar como comensal abrigando patógenos bacterianos (*Legionella* sp., *Francisella tularensis*, *Mycobacterium* *vium*, *Burkholderia* spp., *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Afipia felis* e *Escherichia coli*) e virais (Adenovírus, Minivírus e Herpes simplex), possibilitando sua sobrevivência, propagação e colonização em seres humanos, contribuindo assim para a transmissão de outras doenças (GREUB; RAOULT, 2004 ; BERGER et al., 2006; SCHEID; SCHWARZENBERGER, 2012; KHAN, 2015; BALCZUN; SCHEID, 2017). De acordo com Verani et al. (2016) *Acanthamoeba polyphaga* pode proteger Adenovírus Humano (HAdV) do tratamento de desinfecção de água com hipoclorito de sódio. Recentemente foi relato que *Acanthamoeba castellanii* pode fornecer uma maior virulência ao fungo *Cryptococcus neoformans* (RIZZO et al., 2017).

2.2 CERATITE POR *Acanthamoeba*

A ceratite por *Acanthamoeba* é uma doença de reconhecimento relativamente recente e nas últimas décadas, o seu manejo clínico tem sido

motivo de vários estudos, sendo considerada uma infecção de difícil diagnóstico e tratamento (KHAN; TAREEN, 2003, LORENZI-MORALES et al., 2015). A CA é uma infecção que pode causar deficiência visual e, se agravada, pode resultar em cegueira. A perda de visão ocorre em 33% dos pacientes e o transplante de córnea é necessário em cerca de 26% dos casos (ROBAEI et al., 2015). Sendo a incidência relatada, de CA, em países desenvolvidos de 1 a 33 casos/1.000.000 de usuários de lentes de contato por ano (RADFORD et al., 2002).

Diversos fatores então envolvidos no desenvolvimento da doença, incluindo o potencial patogênico da linhagem envolvida na infecção, a demora no diagnóstico e o estado imunológico do hospedeiro (NIEDERKORN, 2002). A população de maior risco em adquirir a ceratite amebiana são os usuários de lentes de contato, devido a lesões prévias na córnea (OTRI et al., 2013). É relatado que em torno de 90% dos casos de ceratite amebiana ocorrem nesse grupo de pacientes (NIEDERKORN et al., 1999; SHARMA et al., 2000; DART et al., 2009; TU; JOSLIN, 2010). Os demais casos ocorrem devido a trauma ocular com agentes externos, como poeira, terra ou lodo (SRINIVASAN et al., 2003). A falta de higiene, o armazenamento indevido de lentes de contato e uso de soluções de lavagens contaminadas também são identificadas como fatores de risco para a CA (COPE et al., 2016, RADFORD et al., 2002).

O mecanismo de infecção por *Acanthamoeba* na CA envolve uma série de processos, como o contato do trofozoíto com a córnea do hospedeiro, seguido da adesão e posterior penetração nas células do epitélio. A córnea deve estar com lesões prévias, como os microtraumas naturalmente causados pelas lentes ou devido a lesões acidentais. A aderência ocorre por uma adesina as glicoproteínas manosiladas expostas nas células lesadas. Esse contato entre a manose e o trofozoíto induz a secreção de proteases (serino-protease, cisteino-protease, elastase e metaloproteases) desorganizando o tecido e favorecendo a fagocitose celular (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; KHAN, 2001) (FIGURA 2). Uma protease importante produzida por *Acanthamoeba* MIP-133 degrada o colágeno tipo IV presente na córnea, possibilitando assim a penetração ocular (CLARKE et al., 2005).

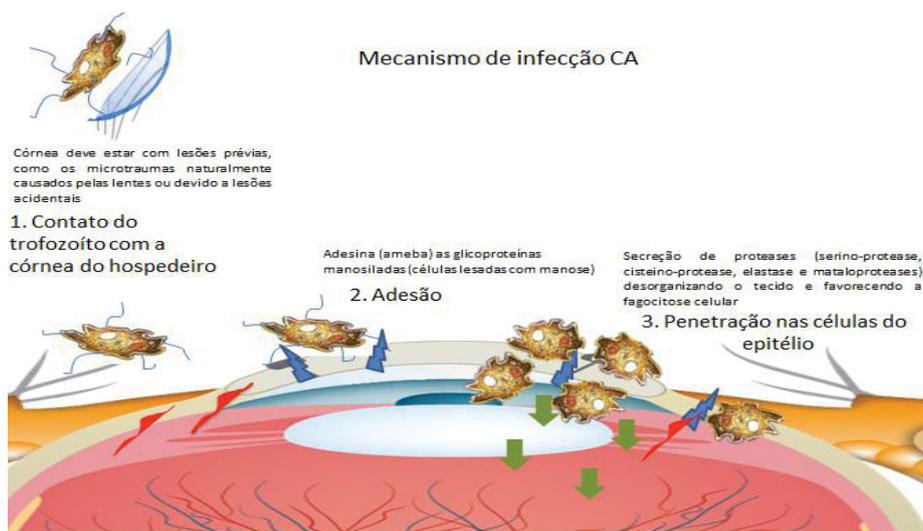


FIGURA 2. MECANISMO DE INFECÇÃO POR *Acanthamoeba* NA CERATITE AMEBIANA. Para infecção primeiramente a córnea deve estar com lesões prévias, como os microtraumas naturalmente causados pelas lentes ou devido a lesões (1), o trofozoíto então entra em contato olho, seguindo de adesão na córnea através do contato entre a manose do hospedeiro e adesina do trofozoíto (2), esse processo estimula a indução e a secreção de proteases (serino-protease, cisteino-protease, elastase e metaloproteases), permitindo a desorganização do tecido e favorecimento a fagocitose celular (3). **Fonte:** Adaptado de Marciano-Cabral; Cabral (2003) e Khan (2001).

A ceratite por *Acanthamoeba* é frequentemente confundida com outras ceratites infecciosas (causadas por fungos, bactérias e vírus) que acabam retardando o início do tratamento específico (ALVARENGA et al., 2000; WALOCHNIK et al., 2000 b; KHAN; TAREEN, 2003; KHAN, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2015). Geralmente o estágio inicial da CA é confundido com a ceratite herpética, e quando o paciente apresenta um estágio avançado, é similar à ceratite fúngica (ALKHARASHI et al., 2015).

Outra questão importante são as infecções mistas, com bactérias e fungos. O tratamento para *Acanthamoeba* deve ser mais intenso, com drogas específicas, podendo durar até um ano ou mais, dependendo do grau, devido ao encistamento dos trofozoítos e conseqüentemente maior resistência do agente (IOVIENO et al., 2010). O diagnóstico e tratamento da CA são essenciais, pois se não iniciados precocemente, podem levar a perda de visão (DUA et al., 2009).

O prognóstico é, geralmente, ruim devido ao atraso significativo no diagnóstico e frequente falta de tratamento médico efetivo (ALKHARASHI et al., 2015; LOENZO-MORALES et al., 2015).

Os métodos atuais de detecção da CA envolvem a cultura e identificação microscópica do raspado de córnea. Dados adicionais podem ser

obtidos da análise de todo o material utilizado no manuseio, desinfecção e armazenamento das lentes de contato, como por exemplo, a cultura desses materiais. Técnicas baseadas na detecção de DNA do parasito (THOMPSON et al., 2008) e a microscopia confocal, essa ultima permitindo a visualização do parasito direto na córnea do paciente (DAAS et al., 2017) também vem sendo utilizadas, porém seu uso ainda é mais restrito para a realidade de muitos centros oftalmológicos.

Os medicamentos mais utilizados para tratamento da CA compreendem as biguanidas (polihexametileno biguanida (PHMB) 0,02% a 0,06% e clorhexidina 0,02% a 0,2%) eficazes contra cistos e trofozoítos, danificando as membranas citoplasmáticas e componentes celulares, e as diaminas (isetionato de propamidina 0,1% e hexamidina 0,1%), alterando a permeabilidade membrana celular. Esses medicamentos são usados combinados para maior eficácia do tratamento, sendo que em alguns casos primeiramente utiliza-se, de preferencia, as biguanidas, pois não apresentam efeito citotóxico para o tecido epitelial da córnea (MAYCOCK; JAYASWAL, 2016).

2.3 RESPOSTA IMUNE

Os mecanismos de defesa ativados no organismo estão relacionados com processos de citólise e ação celular, tanto de macrófagos como de neutrófilos, ambos mediados por fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ) favorecidos pela presença de anticorpos específicos, capazes de matar tanto trofozoítos quanto cistos (NIEDERKORN, 2002; HURT et al., 2003). A depleção de macrófagos afeta a gravidade e cronicidade da doença (VAN KLINK et al., 1996). IL-8 é relatada em níveis maiores em resposta inflamatória contra CA (CARNT et al., 2017), ela é responsável pela quimiotaxia inflamatória ativando neutrófilos (GHASEMI et al., 2011), já reportados como principais células na resposta contra CA.

Os anticorpos produzidos e encontrados no olho, IgG e IgA, são capazes de realizar opsonização, fagocitose, e citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos, como os macrófagos (SAID et al., 2004). A imunização oral de camundongos com antígenos de *Acanthamoeba* induz a produção de anticorpos IgA, demonstrando uma inibição na aderência dos

trofozoítos às células epiteliais da córnea *in vitro* (LEHER et al., 1999; CLARCK; NIEDERKORN, 2006).

Receptores tipo *Toll* 4 (TLR4) desempenham um papel essencial na resposta imune do hospedeiro contra *Acanthamoeba* (REN et al., 2010; REN; WU, 2011; PAN; WU, 2012; ALIZADEH et al., 2014). Da mesma forma, uma expressão aumentada de TLR2 e TLR4 também foi relatada em pulmões murinos infectados por cepas de genótipo T4 (DERDA et al., 2016) e cérebro (WOJTKOWIAK-GIERA et al., 2016), em modelo animal de EAG. As amebas do gênero *Acanthamoeba* são capazes também de bloquear repostas inflamatórias do hospedeiro induzindo uma produção significativa de IL-10 a partir de células efectoras, podendo assim produzir uma evasão do sistema imune e limitando a resposta inflamatória (MATTANA et al., 2016).

O sistema complemento também desempenha um papel crítico na defesa do hospedeiro. A sua principal função seria reconhecer e promover a eliminação do microrganismo invasor por meio de lise e também estimular a fagocitose, pela deposição de fatores (C3b). Sabe-se que algumas espécies de *Acanthamoeba*, de potencial patogênico, são resistentes à lise pelo complemento. Segundo Marciano-Cabral e Toney, algumas espécies têm a capacidade de inibir a atividade do complemento hemolítico a partir de soro humano normal resistindo à lise celular (GUTIERREZ-KOBEH et al., 1997; MARCIANO-CABRAL; TONEY, 1988).

Já foi demonstrado que as proteínas da via do complemento, bem como fatores reguladores do complemento, estão presentes na córnea e nas lágrimas, mas pouco se conhece acerca do papel das proteínas específicas da via do complemento na patogênese de CA. Acredita-se que o fator do complemento C3 liga-se à proteína ligadora de manose, então C3 é internalizado e depletado o que resultaria na evasão do sistema imune do hospedeiro (MONDINO et al., 1980, WILLCOX et al., 1997, RITCHIE et al., 2002). Em outro estudo, foi demonstrado que uma serino-protease secretada por *Acanthamoeba healyi* degrada proteínas como fibrinogênio, anticorpos humanos do tipo IgG e IgA, albumina e hemoglobina (KONG et al., 2000).

2.4 ESTUDO PROTEICO DE ISOLADOS DE *Acanthamoeba*

A avaliação da expressão proteica e estudo antigênico de protozoários fornecem uma perspectiva promissora na diferenciação e caracterização funcional dos diferentes componentes presentes em cada cepa (GARATE et al., 2006; TURNER et al., 2005; WALOCHNIK et al., 2004). As análises de propriedades bioquímicas e imunológicas das proteínas podem contribuir com informações importantes sobre possíveis marcadores de patogenicidade, além de permitirem a caracterização de antígenos estágio-específico, o que é relevante considerando que o ciclo da *Acanthamoeba* envolve duas formas evolutivas (cisto e trofozoíto). Estudos anteriores já utilizaram os perfis proteicos e antigênicos como estratégia para diferenciar *Acanthamoeba* patogênica e não patogênica por Walochnik et al. (2004).

Becker-Finco et al. (2012), produziram alguns anticorpos monoclonais murinos específicos para proteínas presentes em *Acanthamoeba*. Um deles, denominado mAb3, foi capaz de identificar domínios antigênicos compartilhados por dois isolados clínicos e um isolado ambiental potencialmente patogênico, porém não reconheceu um isolado ambiental sem patogenicidade. Quando testado frente aos antígenos de *Acanthamoeba* sob condições redutoras e não redutoras observou-se uma reatividade para um componente proteico, com aparente massa molecular de 130 KDa que se sugeriu ser a proteína ligadora de manose (MBL). Segundo Garate et al. (2006), a MBL pode estar relacionada à patogenicidade pois atua na adesão do trofozoíto ao tecido alvo do hospedeiro. Além disso, a proteína ligadora de manose poderia estar envolvida no mecanismo de ativação do sistema complemento.

Sendo assim, um dos objetivos deste estudo foi identificar/confirmar o alvo do mAb3 nos diferentes isolados patogênicos de CA, avaliar a importância do mesmo no mecanismo de patogenicidade, associado com a ativação do SC e analisar a capacidade de detecção de trofozoítos pelo mAb3 por citometria de fluxo.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Realizar estudo imunológico e proteômico do mAb3 e do seu alvo e avaliar a resistência ao sistema complemento de diferentes isolados, para estimar o potencial patogênico das amostras estudadas.

3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar o anticorpo mAb3 quanto aos aspectos bioquímicos e especificidade frente a diferentes isolados de *Acanthamoeba*.
- Identificar a proteína alvo do mAb3 e inferir sua atividade biológica.
- Avaliar a suscetibilidade dos isolados de *Acanthamoeba* frente à ativação do sistema complemento, na presença ou não do mAb3.
- Avaliar a capacidade do mAb3 na detecção de trofozoítos por citometria de fluxo.

4 METODOLOGIA

Fluxograma com a estratégia experimental utilizada para alcançar os objetivos propostos (FIGURA 3).

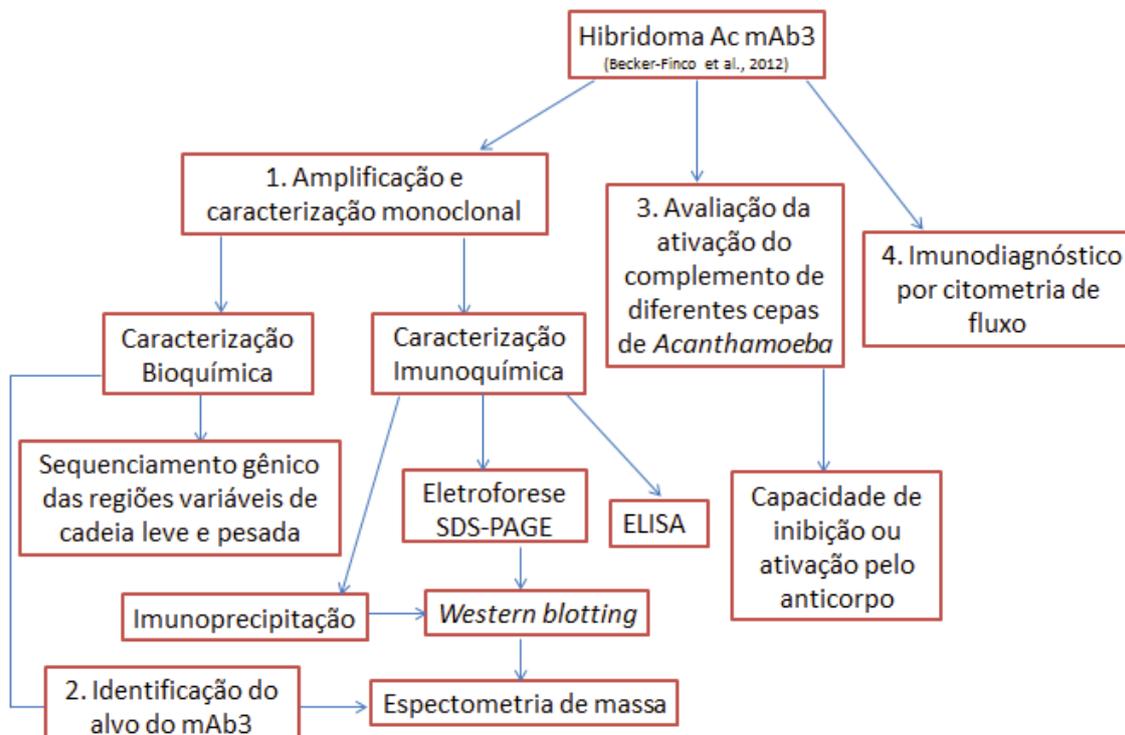


FIGURA 3: FLUXOGRAMA DE TRABALHO. **Fonte:** a autora (2017).

Fluxograma representar os objetivos

4.1 ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *Acanthamoeba*

4.1.1 Culturas de *Acanthamoeba*

As amostras clínicas e ambientais de *Acanthamoeba* sp. foram mantidas em cultivo axênico, em meio PYG (proteose – peptona extrato de levedo) suplementado 2% de *Penicilina e streptomicina* (PS – Gibco 15140-122) e 10% Soro Fetal Bovino (SFB) (ROWBOTHAM, 1980).

Os isolados ALX e LG, de pacientes com ceratite amebiana, e AR14 e AR15, (de poeira de ambiente doméstico, da residência de um paciente com ceratite amebiana) foram cedidos gentilmente pela Prof^a. Dr^a. Cinthia Furst Leroy Gomes da Universidade Federal do Espírito Santo. Os mesmos foram isolados em meio ágar soja e caracterizados pelos critérios fisiológicos de termo e osmotolerância. As culturas usadas no presente estudo foram

axenizadas entre 2007 e 2008 e são, portanto, amostras em cultivo axênico prolongado (DUARTE et al., 2013) (TABELA 1).

O isolado R2P5 também foi obtido em meio ágar soja, de poeira doméstica, sendo identificado como genótipo T1 por Possamai (2012). Esse isolado foi axenizado em 2014 no Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (TABELA 1). A amostra AC-G1 foi isolada recentemente, 2016, cedida gentilmente pela MSc Cynara Oliveira Possamai da Universidade Federal do Espírito Santo – Departamento de Patologia. Devido a sua axenização recente, ainda não foi obtido o genótipo da mesma, porém sabe-se que é pertencente ao grupo I (TABELA 1).

Outras duas culturas de referência do *Acanthamoeba* *poliphaga* foram incluídas, para fins de comparação nos ensaios imunológicos e de lise pelo complemento. Essas culturas foram aqui denominadas AP2 (ATCC # 30461, isolado clínico de lesão de ceratite amebiana) e AP4 (ATCC # 30872, isolado ambiental obtido de água fresca) (TABELA 1).

TABELA 1: CEPAS E ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Acanthamoeba*.

Isolado	Origem	Genótipo*	Grupo Morfológico**	Ano de axenização
ALX	Raspagem da córnea de um paciente com CA*** associada ao uso de lentes de contato. Poeira doméstica, Vitória-ES, Brasil	T4/2	Grupo II	2006
LG	Raspagem da córnea de paciente com CA*** associada ao uso de lentes de contato. Poeira doméstica, Vitória-ES, Brasil	T4/13	Grupo II	2008
AR14	Poeira doméstica, Vitória-ES, Brasil	T4/16	Grupo II	2007
AR15	Poeira doméstica, Vitória-ES, Brasil	T11	Grupo II	2007
R2P5	Poeira doméstica, Vitória-ES, Brasil	T1	Grupo III	2011
AC-G1	Solo, Vitória-ES, Brasil	-	Grupo I	2016
AP2	ATCC 30461, raspagem da córnea, Houston, TX, EUA	T4	Grupo II	1973
AP4	ATCC 30872, água fresca, Tuskegee, AL, EUA	T2	Grupo III	1965

*Genotipagem realizada por sequenciamento gênico do 18S-rDNA (Duarte et al., 2013, Possamai (2012) e **agrupamento morfológica de acordo com Pussard e Pons (1977) ***CA = Ceratite amebiana. **Fonte:** a autora (2017).

4.1.2 Produção de Antígenos

As amostras descritas anteriormente (1×10^6), após cultivo, foram centrifugadas à 500xg por 10 min, lavadas e suspensas em 1 mL de PBS 1X com 10 μ L de inibidor de protease. O processo de sonicação foi realizado com 15 pulsos de 40 volts de 1 min com intervalos de 30 segundos a -4°C . A solução foi centrifugada a 1000xg por 10 min e o extrato solúvel foi recuperado para posterior dosagem.

4.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MONOCLONAL

4.2.1 Amplificação dos hibridomas e purificação dos anticorpos monoclonais anti-*Acanthamoeba*

Os hibridomas produtores de anticorpos anti-*Acanthamoeba* (mAb3), foram previamente produzidos pelo Laboratório de Imunoquímica (Limq) da UFPR (BECKER-FINCO et al., 2012). Para este estudo as células foram descongeladas e então amplificadas com base no protocolo descrito pelo autor, o sobrenadante celular foi purificado, armazenado e testado, por *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *Western Blotting* e citometria de fluxo, bem como utilizado para sequenciamento, das regiões variáveis de cadeia leve e pesada do anticorpo, e construção de uma coluna para imunoprecipitação de extratos proteicos isolados.

4.2.2 Sequenciamento gênico das regiões variáveis de cadeia leve e pesada do mAb3

Para sequenciamento das regiões variáveis foi feita a extração do RNA mensageiro dos hibridomas mAb3 pelo método trizol. Obtenção do cDNA por transcrição reversa e então realizada a amplificação por PCR e sequenciamento das regiões que codificam as cadeias variáveis leves e pesadas do anticorpo. O sequenciamento foi realizado de acordo com o protocolo usado por Fields et al. (2013). A cadeia variável pesada (VH) foi amplificada com a utilização de *primers* degenerados IGH-For (GAC AGT GGA

TAR ACM GAT GG) e IGH-Rev (GAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG) e a cadeia variável leve (VL) com os *primers* V-LAMBDA-Rev (CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA) e V-LAMBDA-For (CTT GGG CTG ACC TAG GAC AGT). Após verificação da presença do fragmento de DNA que codificava as cadeias por gel de agarose 1,5%, cada fragmento foi purificado e clonado no vetor PGEM T-easy por meio de ligação usando ligase T4 e transformado em células competentes *E. coli* TG1. Após transformação os plasmídeos contendo o inserto foram selecionados, analisado em gel de agarose 1,5% e recuperados pela técnica de extração de DNA plasmidial (*miniprep*), purificados, novamente analisados em gel de agarose 1,5% e dosados no espectrofotômetro (*Thermo Scientific Nano Drop 2000*). Em seguida, foi realizada purificação do DNA e reação de sequenciamento, o *primer* utilizado para sequenciamento foi o T7 universal (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG), no sequenciador 3500XL, *Applied Biosystems, Genetic Analyzer*, seguindo o modelo de sequenciamento de DNA por SANGER.

4.2.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Placas NUNC de 96 *wells* foram incubadas com 100 µL de uma solução de 10 µg/mL dos antígenos solúveis dos trofozoítos em tampão carbonato (NaHCO₃ 100 mmol/L, pH 9,6) durante 12-16 h a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem (0,05% *Tween*-salina-SL) e bloqueadas com a solução de bloqueio (caseína a 2% diluída em PBS), por 1 h a 37°C. A placa foi então incubada com uma solução contendo o anticorpo mAb3, ou sobrenadantes celulares diluídos em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína, 0,05% *tween* 20). Um segundo anticorpo foi adicionado à placa, imunoglobina heteróloga a anti-IgG murino conjugada com a enzima peroxidase (Sigma, diluído 1:4000 em tampão de incubação). A revelação da interação específica dos anticorpos foi realizada adicionando-se a solução ortofenilenodiamino (OPD), após 15 min de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 20 µL de ácido sulfúrico diluído 1:20. As leituras da absorbância foram feitas a 490 nm.

4.2.4 Eletroforese SDS-PAGE

Para eletroforese, proteínas solúveis dos diferentes isolados (1,5 ou 5 µg) foram separadas por SDS-PAGE (12,5% de gel de poliacrilamida) segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). Os antígenos proteicos também foram avaliados por eletroforese em condições não desnaturante, como descrito por Becker-Finco et al. (2012). A migração ocorreu em tampão de migração (Tris 0,025 mol/L, glicina 0,2 mol/L e SDS 0,5%, pH 8.3) sob voltagem de 100 V por 180 min.

4.2.5 Western blotting

As proteínas do gel foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon™ *Transfer Membranes* – MILLIPORE) de 0,22 µm, submetidas a uma corrente de 24 V durante 16 h e, posteriormente, por mais uma hora a 48 V em tampão de transferência com pH 8,3 contendo glicina 0,2 mol/L, Tris 0,025 mol/L e metanol 20% (v/v). Após a eletrotransferência, a presença das proteínas foram certificadas mergulhando-se a membrana de PVDF em solução de *Ponceau* 0,2% e 10% de ácido acético. Com a visualização das bandas, a membrana foi lavada em tampão PBS-*Tween* (PBS-T) 0,05% por três vezes de 5 min e, posteriormente, bloqueada com tampão PBS-T 0,3%, por 1 h, sob agitação e a 37°C. Após o bloqueio, a membrana foi lavada novamente por três vezes em tampão PBS-T 0,05% e, em seguida foi acrescentado o anticorpo monoclonal mAb3 em diferentes concentrações (0,5 à 5,0 µg/mL), ou soros murinos contendo anticorpos policlonais anti-AP4 e anti-AP2 (1:100) diluídos em PBS-T 0,05%. As membranas foram então incubadas a 37°C por 2 h. Após três lavagens como descrito anteriormente, as membranas foram incubadas por 1 h a 37°C e, sob agitação, na presença de anticorpos anti-*mouse*-peroxidaseanti-his (Sigma) em diluição 1:4000. Foi realizada duas lavagens de PBS-T 0,05%, seguidas de mais três lavagens com PBS. Para revelação foi utilizada uma solução de PBS contendo 0,025% de 4-cloro 1-naftol diluído em 1 mL de metanol, 0,05% de diaminobenzidina (DAB) em presença de H₂O₂ 0,04% (v/v) ou por

quimiluminescência utilizando uma solução de revelação como luminol e filme fotográfico.

4.2.6 Citometria de fluxo

Trofozoítos das amostras ALX, AP2, AR14, AR15, LG, R2P5 e AC-G1 de *Acanthamoeba*, crescidos logaritmicamente, foram centrifugados a 500xg por 10 min, lavados com PBS, contados e suspensos para uma densidade de 1×10^6 à 1×10^3 células/mL. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min, bloqueadas com albumina 2% e lavadas com PBS 3 vezes entre cada uma das etapas. Para testar a reatividade do anticorpo frente à amostra na sua forma nativa, os trofozoítos foram incubados com mAb3 (125 μ g/mL) por 12 h. As células foram então lavadas com PBS e incubadas com ALEXA flúor 488 *goat anti-mouse* IgG [H+L] (Molecular probes®) (1:300). A intensidade de fluorescência foi medida no citômetro (BD FACSCalibur™) utilizando o filtro FL1 - 488 nm. Como controles foram utilizados a comparação da própria fluorescência amostral e a reatividade cruzada do anticorpo secundário empregado.

4.2.7 Imunoprecipitação da proteína alvo do mAb3 e análise por espectrometria de massa (MS)

O mAb3 foi incubado com a resina de proteína A e G (*Protein G/A Sepharose 4 Fast Flow* – GE Health care), 1 mg de mAb3 para 200 μ L de proteína A e G, de acordo com a capacidade da resina estabelecida pelo fabricante, para produção de uma coluna de afinidade. O processo de incubação durou 1 h a temperatura ambiente sob agitação constante. Realizou-se então lavagens sequenciais com PBS pH 7,4 e pH 8,0 (duas lavagens) seguidas por centrifugação a 28.500xg por 6 min. Adicionou-se dimetilpimelimidato (DMP) 13 mg/mL, para estabelecer uma ligação estável (*Crosslinking*) entre o anticorpo mAb3 e as proteínas recombinantes A e G, dissolvido em trietanolamina 0,2 M pH 8,2 na proporção 1:1 com volume de resina (VR) que foi incubado durante 30 min sob agitação. Etanolamina 0,1 M pH 8,2, também foi adicionado, na proporção 1:1 com o VR, por 5 min,

posteriormente centrifugou-se a solução. Foram realizadas duas etapas de lavagem e centrifugação, uma com etanolamina e uma com PBS pH 7,4. Glicina 0,1 M pH 2,7 foi incubada 2 vezes durante 5 min seguido por uma nova centrifugação. Para finalizar, o pH foi reestabelecido com PBS pH 7,4 e a coluna armazenada em PBS-azida sódica 0,05% a 4°C. Todas as etapas de incubação foram realizadas em temperatura ambiente, enquanto as centrifugações foram feitas a 4°C. Para purificar a proteína alvo do mAb3, o extrato bruto de *Acanthamoeba* sp. foi incubado 24 h com a coluna de afinidade previamente preparada. Após 10 lavagens com PBS pH 7,4, a proteína foi eluída com glicina 0,1 M pH 2,7, cujas frações foram separadas e testadas com o reagente de Bradford, determinando assim as frações de interesse, em seguida as mesmas foram separadas e dialisadas em PBS pH 7,4 (FIGURA 4). O procedimento para Imunoprecipitação e purificação da proteína alvo do mAb3 foi adaptado do *Crosslinking Protocol – Procedure for crosslinking the antibody to the beads* Abcam®.

A proteína purificada foi resolvida por SDS-PAGE (12,5% de gel de poli-acrilamida), corada por prata e as bandas identificadas foram excisadas e enviadas para Plataforma de Espectrometria de Massas-PR, Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, para seu processamento e análise. Foi injetada metade da massa dos peptídeos eluídos do gel no cromatógrafo Easy-nLC 1000 da Thermo. A separação dos peptídeos foi feita com gradiente linear de 60 min de 5 a 40% de acetonitrilo, 5% de DMSO, 0,1% ácido fórmico em uma coluna analítica de 15 cm, com diâmetro interno de 75 µm e partículas de C18 de 3 µm, aquecida a 60°C. Os peptídeos foram ionizados por nano eletro spray (voltagem de 2,7 kV) e injetados no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific). O método de análise foi o seguinte: *scan* inicial no Orbitrap com resolução de 15.000, seguido de seleção dos 10 íons mais intensos, os quais foram fragmentados por CID e analisados no *ion trap*. Paralelamente ao MS2, foi realizado um *full scan* no Orbitrap com uma resolução de 60.000. Na seleção dos íons foi usada uma lista de exclusão de 90 segundos. A opção *lock mass* foi utilizada para obtenção de melhor acurácia – erro abaixo de 0,5 p.p.m. - de massa dos peptídeos tripticos precursores detectados por MS. Os dados foram processados usando um *software* (*Peaks*) que além de se basear em um banco de dados contendo as sequencias

proteicas de *Acanthamoeba*, também identifica os espectros sem o uso do banco específico (*denovo sequencing*).

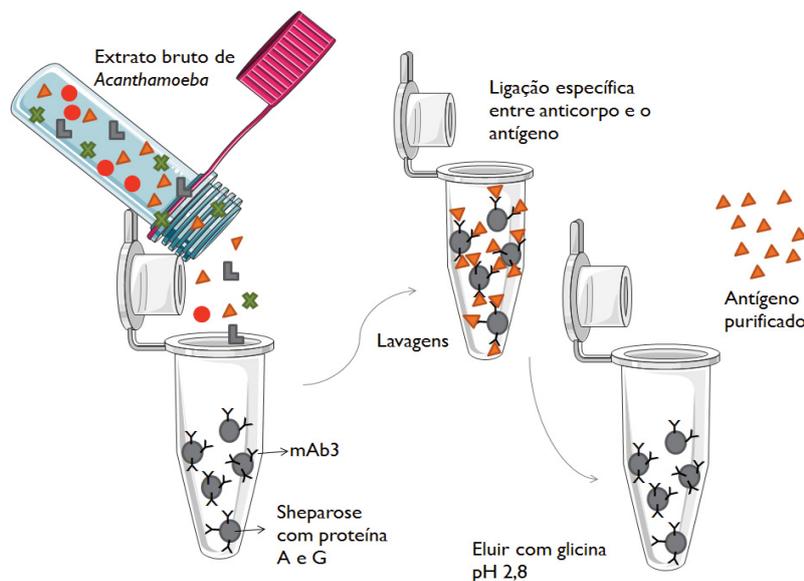


FIGURA 4: PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ALVO DO mAb3 POR IMUNOPRECIPITAÇÃO – Figura esquemática. O anticorpo monoclonal mAb3 é ligado estavelmente com a proteína A e G, formando um imunocomplexo. O extrato bruto de *Acanthamoeba* sp. é incubado com o imunocomplexo permitindo a ligação do antígeno que tenha afinidade pelo mAb3. Após inúmeras lavagens para retirar o que não ligou, o antígeno é eluído com glicina em um pH ácido. **Fonte:** a autora (2017).

4.3 ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO EM DIFERENTES ISOLADOS DE *Acanthamoeba* sp.

Foram realizadas curvas de crescimento de diferentes isolados de *Acanthamoeba* para conhecer a cinética de crescimento *in vitro* identificando as fases logarítmicas e estacionárias de crescimento. Utilizou-se culturas parasitárias em fase de crescimento logarítmico a 28°C com inóculos de 5×10^5 trofozoítos/mL e contagem realizada a cada 24 h, retirando-se 10 μ L da cultura homogeneizada e aplicando-as em Câmara de Neubauer.

Para análise da lise mediada pelo complemento os trofozoítos foram centrifugados a 500xg por 10 min, lavados, contados e o *pellet* ressuspenso em meio PYG para uma concentração de $5,0 \times 10^6$ trofozoítos/mL. A reação foi iniciada ao incubar 100 μ L de parasitas ($5,0 \times 10^5$) mais 100 μ L de SNH diluídos para as seguintes concentrações 0; 12,5; 25 e 50%. Os eppendorfs foram então mantidos a 37°C, por diversos tempos (10, 30 e 60 min). A reação foi parada com adição de 800 μ L de PYG gelado, o tubo mantido em gelo até o momento da contagem. A avaliação dos trofozoítos vivos foi realizada por

microscopia óptica utilizando coloração por *Trian blue*. Os ensaios foram realizados também na presença ou não de EGTA e $MgCl_2$, como se segue:

A) Concentração letal de soro (IC 50): esta parte do ensaio foi realizada para determinar a mínima concentração de soro normal humano capaz de lisar 50% dos parasitas. Nesse ensaio os parasitas foram incubados em diferentes concentrações de SNH (diluição limitante de soro) a 37°C por 30 min; ou seja, $5,0 \times 10^5$ formas trofozoíticas de *Acanthamoeba* em 100 µL de meio PYG e 100 µL de SNH diluído em PYG nas seguintes concentrações 50; 25; 12,5 e 0%. A reação foi incubada a 37°C por 30 min.

B) Cinética de ativação do complemento: nesse ensaio os parasitas foram incubados com soro normal humano por diferentes tempos para determinar a velocidade de ativação das vias do complemento. Para os ensaios de ativação das três vias do complemento agindo sinergicamente (clássica, lectinas e alternativa) foram feitos ensaios com SNH e formas trofozoíticas de *Acanthamoeba* com concentração de 5×10^5 trofozoítos/mL em 100 µL de PYG misturadas com 100 µL de SNH 50% (diluído com PYG), incubados a 37°C por 10, 30 e 60 min. Para os ensaios de cinética de ativação da via alternativa (bloqueio das vias clássica e lectinas) os parasitas foram incubados por diferentes tempos com SNH tratado com EGTA e $MgCl_2$ (o EGTA é um quelante de Ca^{++} , e este íon é requerido pelas vias clássica e lectina para serem ativadas; o Mg^{++} é requerido pela via alternativa). Para esses ensaios formas trofozoíticas de *Acanthamoeba* com concentração de $5,0 \times 10^5$ em 100 µL de PYG foram misturadas com 100 µL de SNH 50% (diluído com PYG, 10 mM de EGTA e 7 mM de $MgCl_2$) incubados a 37°C por 10, 30 e 60 min.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL

5.1.1 Purificação e caracterização bioquímica do mAb3

A purificação do mAb3 foi obtido com sucesso uma vez que a eletroforese SDS-PAGE, na presença de agente redutor (betamercaptoetanol) permitiu observar três bandas, uma de aproximadamente de 150 kDa, outra de

50 e 25 kDa, correspondentes a massa molecular inteira do anticorpo e as cadeias pesada e leve da imunoglobulina mAb3, respectivamente (FIGURA 5).

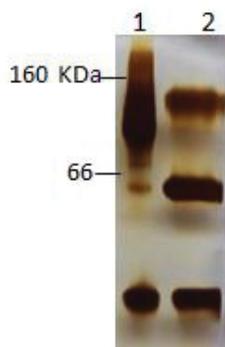


FIGURA 5: PERFIL ELETROFORÉTICO DO ANTICORPO (mAb3). Gel SDS-PAGE 12,5%, corado por prata. (1) Perfil eletroforético do anticorpo purificado preparado com tampão de amostra sem redução. (2) Perfil eletroforético do anticorpo purificado preparado com tampão de amostra com redução (presença de betamercaptoetanol). **Fonte:** a autora (2017).

5.1.2 Sequência gênica das regiões variáveis de cadeia leve pesada do mAb3

Como resultado da amplificação variável de cadeia leve (VL) e pesada (VH), utilizando *primers* específicos, foram obtidos fragmentos de DNA com o tamanho esperado 400 pb para VH e 300 pb VL (FIGURA 6).

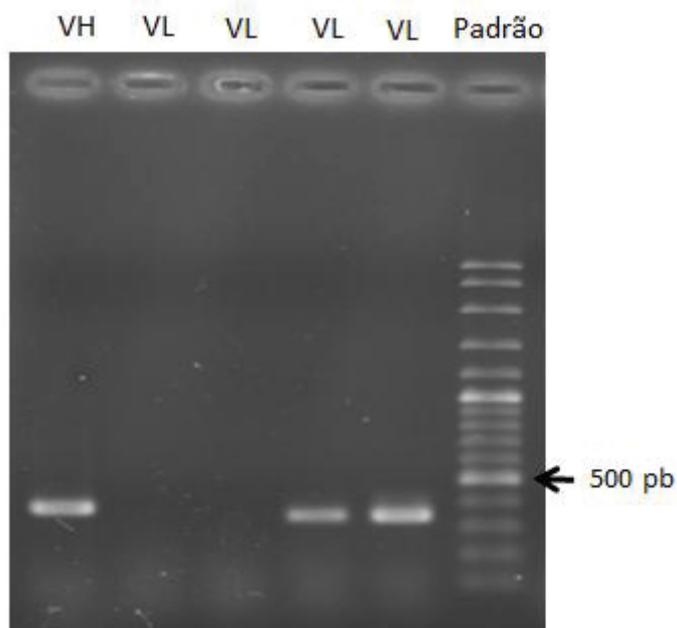


FIGURA 6: ELETROFORESE EM **GEL DE AGAROSE 1,5%** DEMONSTRANDO A AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA (VH) E LEVE (VL). VH com tamanho de aproximado de 400 pb. VL com tamanho aproximado de 350 pb. Padrão 1 Kb Plus DNA Ladder (VIVANTIS). **Fonte:** a autora (2017).

Com base na análise do resultado do sequenciamento, empregando-se a ferramenta interativa IGMT, foi possível confirmar a sequência variável da

cadeia pesada do anticorpo (VH) que apresentou 96,84% de similaridade com sequência murina IGHV3-8*02 F (Ref.AJ972403) e a sequência variável de cadeia leve (VL) que apresentou 97,92% de similaridade com a sequência murina IGLV1*01 F (Ref.J00590). Bem como, foi possível obter a representação da estrutura secundária dos domínios variáveis do anticorpo pela formação do *Collier de Perles*. Observou-se a confirmação de resíduos conservados, uma cisteína na posição 23^o, triptofano na 41^o, aminoácido hidrofóbico na 89^o, cisteína 104^o e fenilalanina ou triptofano na 118^o (FIELDS et al., 2013) (FIGURA 7).

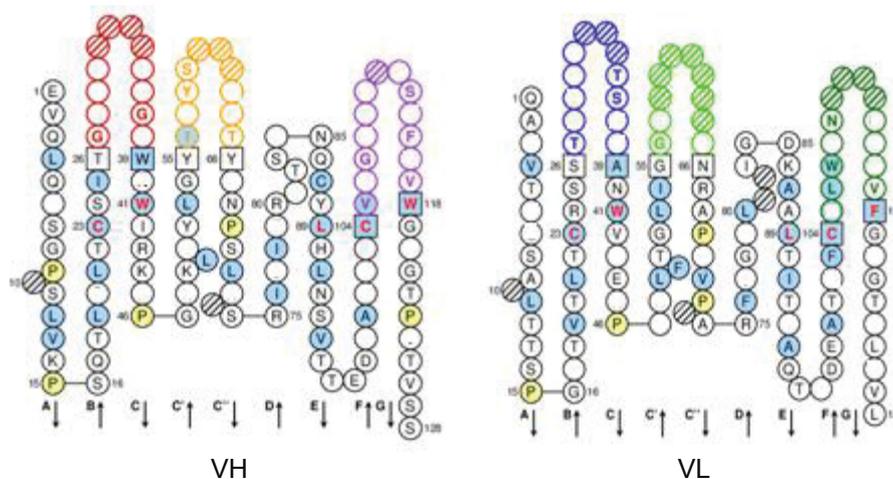


FIGURA 7: SEQUÊNCIAS DOS FRAGMENTOS DE CADEIA PESADA E LEVE DO ANTICORPO mAb3. Representação da estrutura secundária, pelo *Collier de Perles*, dos domínios variáveis do anticorpo mAb3, realizado por meio do programa IGMT. A esquerda a sequência de aminoácidos do fragmento de cadeia pesada VH e a direita o fragmento de cadeia leve VL- λ . **Fonte:** a autora (2017). * Alguns aminoácidos foram propositalmente omitidos, pois esta sequência está em fase de depósito de patente.

5.1.3 Reatividade do mAb3 frente a antígenos de diferentes isolados de *Acanthamoeba* por ELISA e *Western blotting*

O anticorpo monoclonal mAb3, reagiu com os antígenos da cepa AP2, que apresenta potencial patogênico. Todavia, não reagiu com a cepa AP4 que não é patogênica. Como controles negativos e positivos foram utilizados, soro murino pré-imune (PI) e soro murino contendo imunoglobulinas anti-AP2 ou anti-AP4, respectivamente. Foi confirmado que o hibridoma produzido por Becker-Finco e colaboradores (2012), ainda está funcional e secretando imunoglobulinas reativas a cepa patogênica (GRÁFICO 1).

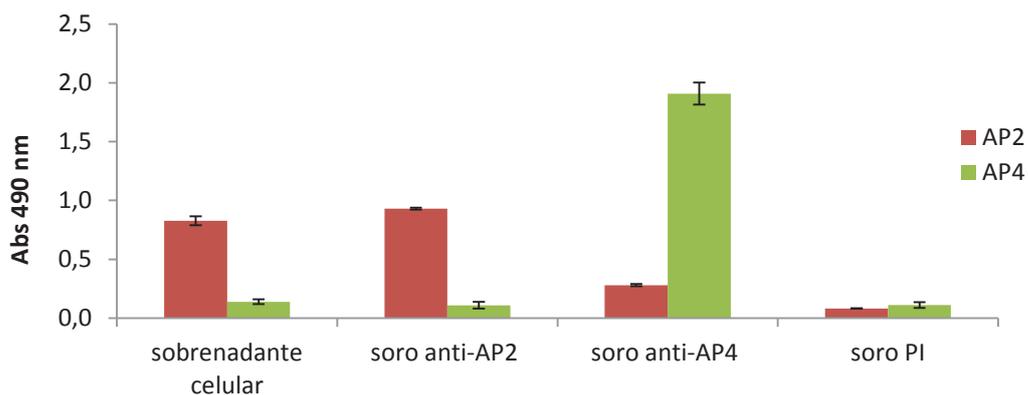


GRÁFICO 1: ELISA DE REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE AOS ISOLADOS PATOGÊNICO (AP2) E NÃO PATOGÊNICO (AP4). Antígenos totais obtidos a partir dos isolados AP2 e AP4 foram adsorvidos à placa na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e testados frente ao sobrenadante celular. Soro pré-imune murino, foi empregado como controle negativo. Soros de camundongos com anticorpos anti-AP4 e anti-AP2, como controles positivos, na diluição de 1:100. **Fonte:** a autora (2017).

A reatividade de mAb3 foi avaliada frente aos extratos totais de proteínas solúveis de *Acanthamoeba* sp., patogênica (AP2) e não patogênica (AP4), empregando-se diferentes concentrações dos anticorpos. Observa-se uma reatividade de maneira dose dependente nas seguintes diluições utilizadas 5; 2,5; 1,25 e 0,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Assim pode-se concluir que baixas concentrações de anticorpo podem ser utilizadas para avaliar a reatividade com o antígeno (GRÁFICO 2).

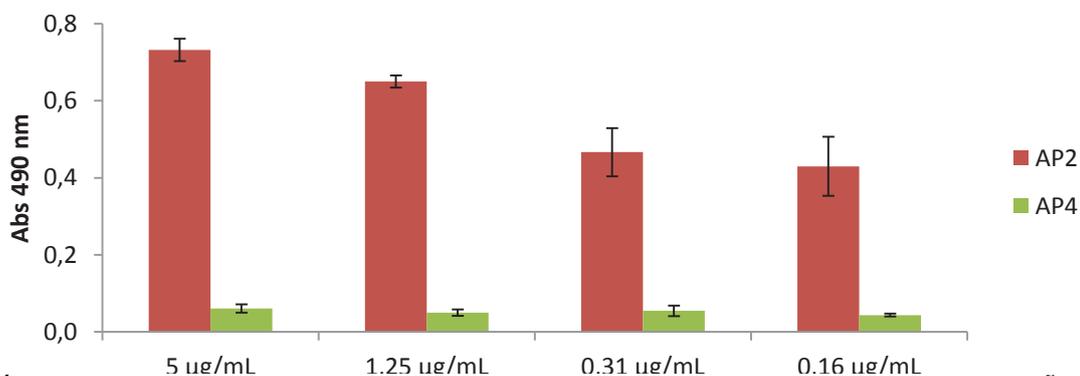


GRÁFICO 2: ELISA DE REATIVIDADE DO mAb3 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FRENTE AOS ISOLADOS PATOGÊNICO (AP2) E NÃO PATOGÊNICO (AP4). Antígenos totais obtidos a partir dos isolados AP2 e AP4 foram adsorvidos à placa na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e testados frente ao mAb3 em diferentes concentrações (5; 2,5; 1,25 e 0,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$). **Fonte:** a autora (2017).

Posteriormente realizamos uma caracterização, por ELISA, de uma quantidade maior de isolados. Observou-se que os antígenos provenientes do isolado ALX foram mais antigênicos quando comparado aos demais. Os controles negativos e positivos (sobrenadante celular de um hibridoma

irrelevante e anticorpos policlonais específicos para AP2 e AP4), resultaram em nenhuma reatividade, ou num reconhecimento, específico para AP2 e reconhecimento, específico para AP2 e AP4, respectivamente (GRÁFICO 3 a).

Devido a alguns fungos também serem causadores de ceratite analisamos a reatividade frente ao mAb3. Os isolados escolhidos foram os principais causadores de ceratite: *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e *Candida* sp., (KARSTEN et al., 2012), e nos nossos ensaios não houve reatividade cruzada, indicando especificidade do anticorpo por antígenos de *Acanthamoeba* (GRÁFICO 3 b). Nesse ensaio, também foram usados anticorpo irrelevante, como controle negativo, bem como soros de camundongo contendo anticorpos anti-AP4 e anti-AP2 (1:100).

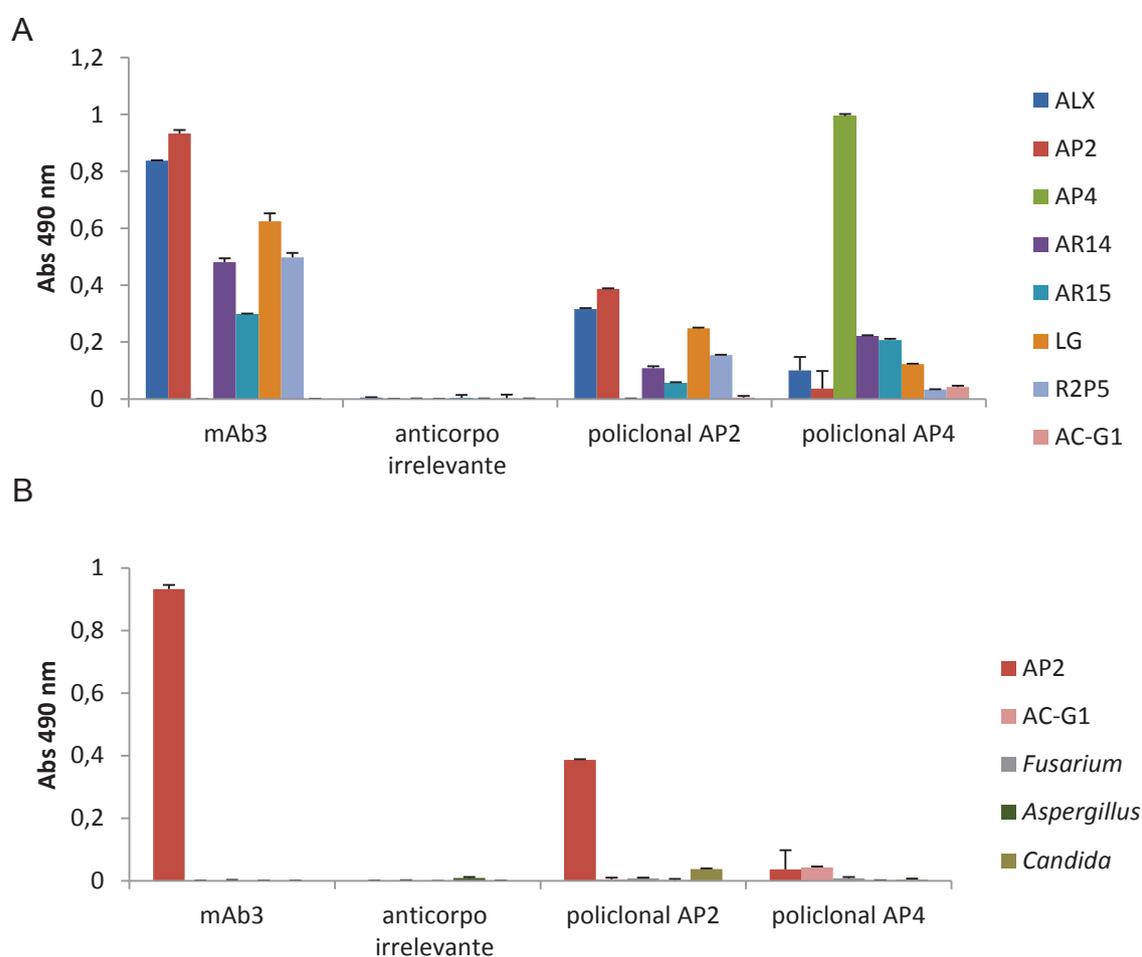
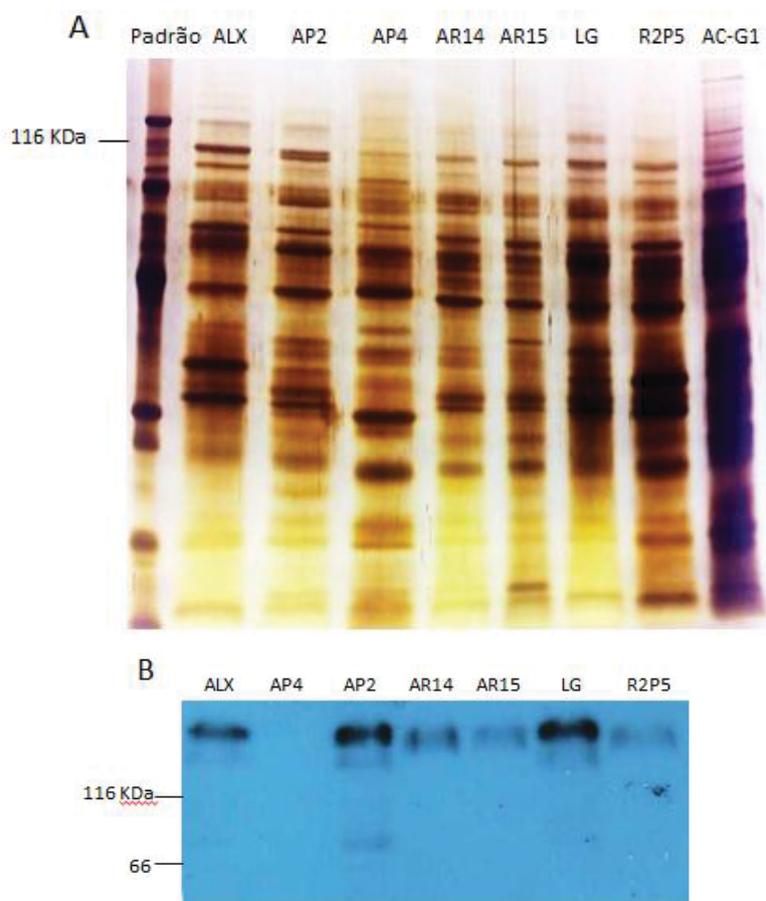


GRÁFICO 3: ELISA DA REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE A ANTÍGENOS DE *Acanthamoeba* E FUNGOS. (A) Antígenos totais obtidos a partir dos isolados ALX, AP2, AP4, AR14, AR15, LG, R2P5 e AC-G1 de *Acanthamoeba*, e (B) antígenos totais obtidos a partir dos isolados de *Acanthamoeba* AP2 e AC-G1 e fungos *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e *Candida* sp., foram adsorvidos à placa na concentração de 10 µg/mL, e testados frente ao mAb3 na concentração de 5 µg/mL. Um soro murino irrelevante foi empregado como controle negativo e soros de camundongos contendo anticorpos anti-AP4 e anti-AP2, como controles positivos, na diluição (1:100). **Fonte:** a autora (2017).

A visualização do perfil proteico, bem como o reconhecimento pelo anticorpo mAb3 foram avaliados a partir dos extratos totais solúveis tanto das amostras clínicas (ALX, AP2 e LG) como das amostras ambientais (AP4, AR14, AR15, R2P5 e AC-G1) de *Acanthamoeba* (FIGURA 8 a; b; c; d) resolvidos por eletroforese SDS/PAGE e ensaios de WB.

Observou-se que o anticorpo monoclonal foi capaz de reconhecer seis dos oito isolados estudados por WB corroborando com o que foi obtido nos ensaios de ELISA. Há um padrão de reconhecimento de bandas conservado na maioria das amostras como também diferenças na expressão do antígeno, pelos diferentes isolados. Nos isolados reconhecidos pelo mAb3 há um predomínio de proteínas de elevada massa molecular, visualizadas em torno de 130 kDa (FIGURA 8 b; c). Soros de camundongo anti-AP4 e anti-AP2 (1:100), foram utilizados para evidenciar o reconhecimento específico do mAb3 (FIGURA 8 d).



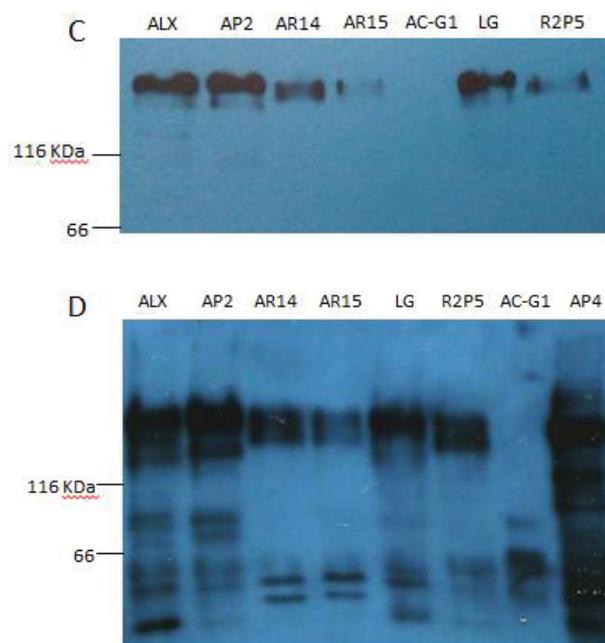


FIGURA 8: REATIVIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL CONTRA ANTÍGENOS DE *Acanthamoeba* VIZUALIZADA POR *WESTERN BLOTTING*. As mesmas concentrações (2 µg/mL) de proteínas solúveis dos isolados de *Acanthamoeba* ALX, AP4, AP2, AR15, AR14, R2P5, LG e AC-G1 foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%. (A) e transferidas para membrana de nitrocelulose (B, C e D). A imuno-reatividade do anticorpo monoclonal mAb3, na concentração de 1,5 µg/mL (B e C) e em relação aos soros de anticorpos policlonais anti-AP2 e AP4 (D) foram avaliadas frente aos antígenos específicos e não específicos. **Fonte:** a autora (2017).

Quanto à reatividade por WB de outros agentes de ceratite (*Fusarium* sp, *Aspergillus* sp. e *Candida* sp.) não foi observada reatividade cruzada, assim como verificado por ELISA, confirmando a especificidade do anticorpo contra *Acanthamoeba* (FIGURA 9 a). O resultado da eletroforese não desnaturante, ainda demonstrou uma diminuição no reconhecimento do mAb3, demonstrando que a região de reconhecimento é determinada por mais de uma localidade proteica (FIGURA 9 b).

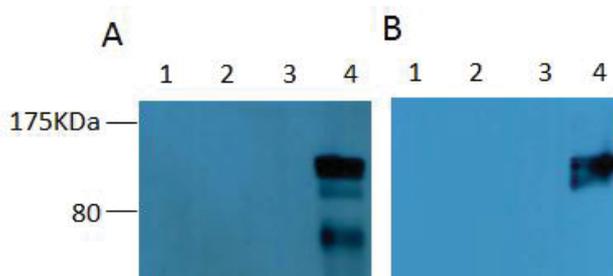


FIGURA 9: REATIVIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL CONTRA ANTÍGENOS DE *Acanthamoeba* E FUNGOS POR *WESTERN BLOTTING*. As proteínas solúveis (1,5 µg/mL) dos isolados de *Fusarium* sp. (1), *Aspergillus* sp. (2), *Candida* sp. (3) e *Acanthamoeba*, isolado ALX, (4) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% (A) ou por Gel Nativo 7,8% (B), e transferidas para membrana de nitrocelulose. A imuno-reatividade do anticorpo monoclonal mAb3, na concentração de 5 µg/mL, foi avaliada frente aos antígenos específicos e não específicos. **Fonte:** a autora (2017).

Anticorpos monoclonais específicos para antígenos de *Acanthamoeba* já foram previamente produzidos, como relatado por Flores et al. (1990), os quais apresentam reatividade para *A. castellanii* e *A. polyphaga*. Kennett et al. (1999) produziram 43 anticorpos monoclonais que reconheceram epítomos de superfície de trofozoítos. Turner et al. (2005), produziu oito anticorpos dos quais sete reconhecem cistos e apenas um reconhece a fase trofozoítica. Um fragmento de anticorpo recombinante mostrou capacidade de se ligar a antígenos presentes em três espécies supostamente patogênicas (*A. castellanii* e duas espécies não identificadas), mas não para espécies supostamente não patogênicas (*Acanthamoeba astronyxcis*, *Acanthamoeba royreba*, *Acanthamoeba palestinensis*, *Acanthamoeba griffini*) (KHAN et al., 2000). O mAb3 apresenta uma atividade de reconhecimento parecida, como a descrita por Khan et al. (2000), tendo afinidade por cepas com potencial patogênico.

Das amostras de *Acanthamoeba* utilizadas no presente estudo que apresentaram reatividade frente ao mAb3, ALX, AP2 e LG, são clínicas, isoladas de casos de ceratite, enquanto que AR14 representa um isolado ambiental (DUARTE et al., 2013), porém todas pertencentes ao genótipo T4, o mais associado a infecções (MACIVER et al., 2013). Outra amostra reativa foi AR15, também ambiental, porém de genótipo T11. T11 é um genótipo que raramente encontrado em casos de ceratite, mesmo assim é considerado o terceiro mais abundante nessas infecções (MACIVER et al., 2013), o que demonstra seu potencial patogênico. Quanto à R2P5, é uma amostra ambiental de genótipo T1, que é identificado em 10% dos casos de encefalite amebiana, sendo também a segunda em relevância na doença após as identificadas no genótipo T4 (MACIVER et al., 2013).

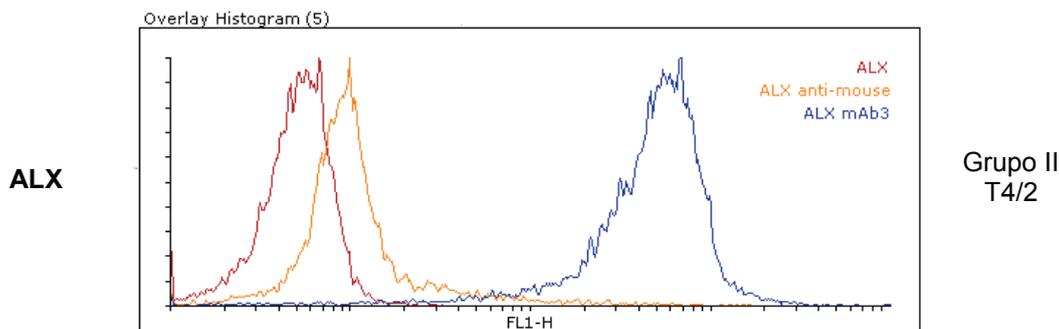
Por outro lado, tanto a amostra AP4 quanto a amostra AC-G1, que não apresentaram reatividade nos ensaios de ELISA e WB, representam isolados de baixa patogenicidade ou sem potencial patogênico reconhecido. AP4 é um isolado obtido de água, previamente caracterizada como não patogênica em vários ensaios biológicos (ROCHA-AZEVEDO; COSTA E SILVA-FILHO, 2007). AC-G1, embora não tenha o genótipo determinado até então, foi caracterizada no grupo morfológico I, de cistos maiores de aspectos estrelado, que se enquadram nos genótipos T7, T8 T9 e T17 (MAGLIANO et al., 2012), não

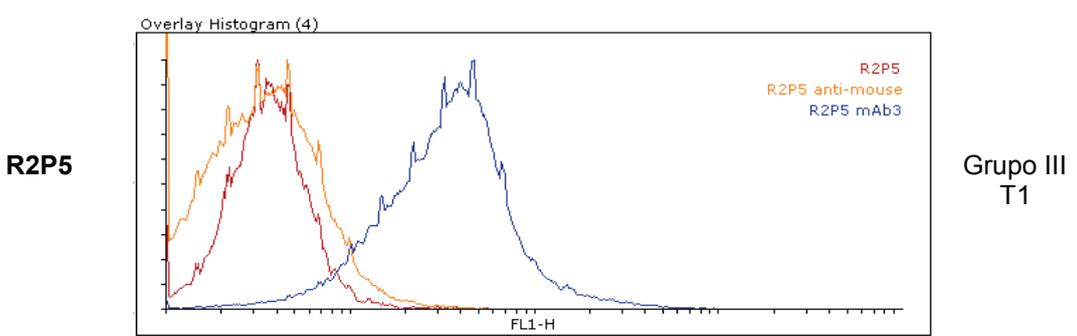
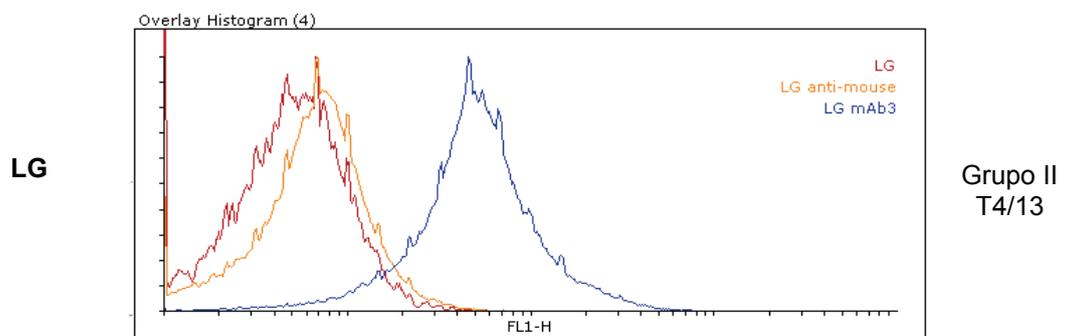
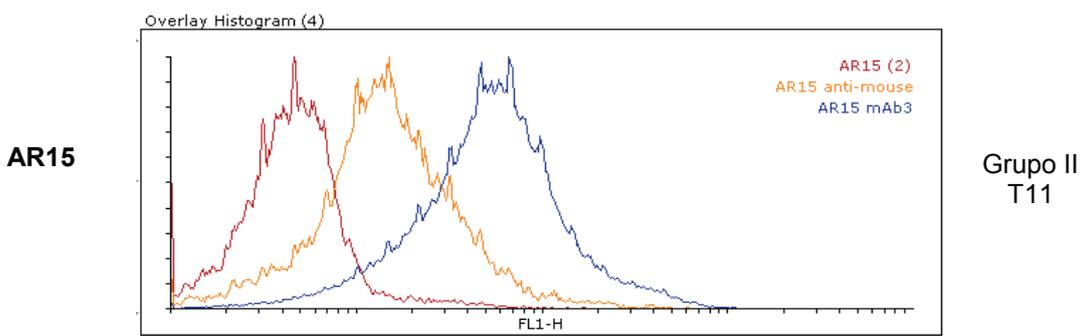
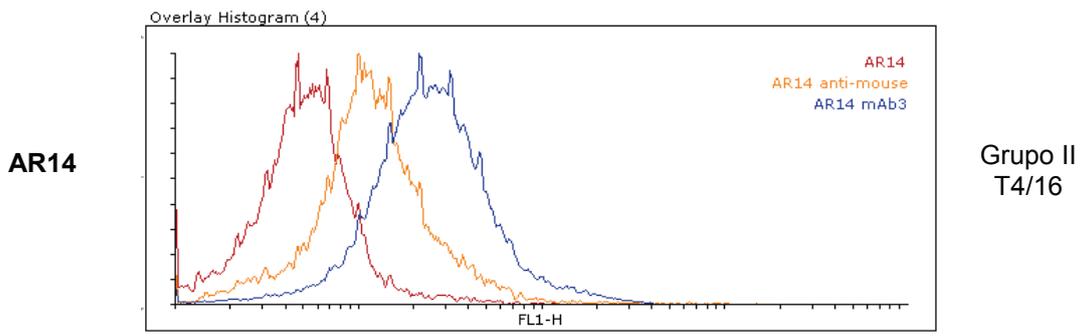
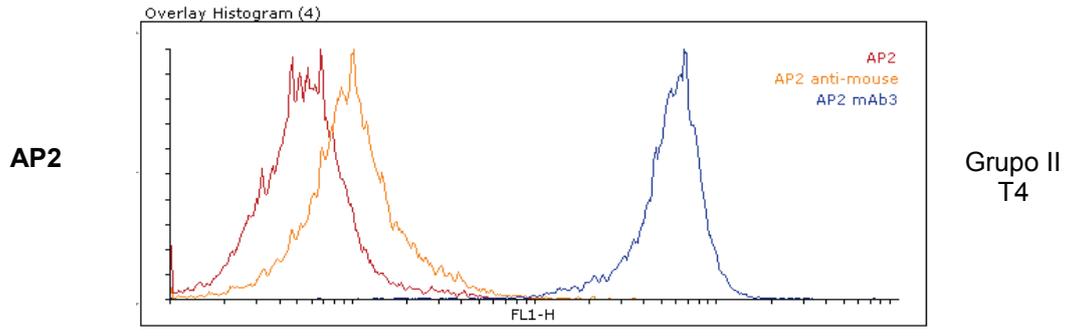
associados a infecções (MACIVER et al., 2013). Considerando esses aspectos, a alta especificidade do mAb3 a amostras de maior patogenicidade ficou demonstradas com os ensaios realizados.

A ausência de reatividade frente aos principais fungos causadores de ceratite, *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e *Candida* sp. (KARSTEN et al., 2012), evidenciam o potencial uso do mAb3 como ferramenta diagnóstica, tendo em vista sua especificidade. A causa da ceratite amebiana pode ser muitas vezes confundida com esses outros microrganismos, levando ao tratamento inadequado e retardando o reconhecimento do agente causador. Como consequência, a infecção progride, ocorre o encistamento das amebas em camadas mais profundas da córnea, o que resulta em sequelas mais graves e necessidade de tratamento mais prolongado (WALOCHNIK et al., 2000 a; KHAN; TAREEN, 2003).

5.1.4 Reconhecimento de diferentes isolados de *Acanthamoeba* por Citometria de fluxo

A reatividade do mAb3 frente aos trofozoítos de *Acanthamoeba* sp. foi avaliada por citometria de fluxo e pode-se observar que o alvo do mAb3 trata-se provavelmente de uma proteína de superfície. Houve a mesma reatividade encontrada por ELISA e *Western blotting*, exceto para amostra AR15 que apresentou uma reatividade maior que a observada nos ensaios anteriores (FIGURA 10 e TABELA 2). A citometria de fluxo foi realizada com 1×10^6 trofozoítos frente a 125 µg/mL de mAb3 e 1:300 de ALEXA flúor 488 *goat anti-mouse* IgG [H+L] (Molecular probes®), utilizando como controles a própria fluorescência das amostras e o isolado na presença de ALEXA flúor 488.





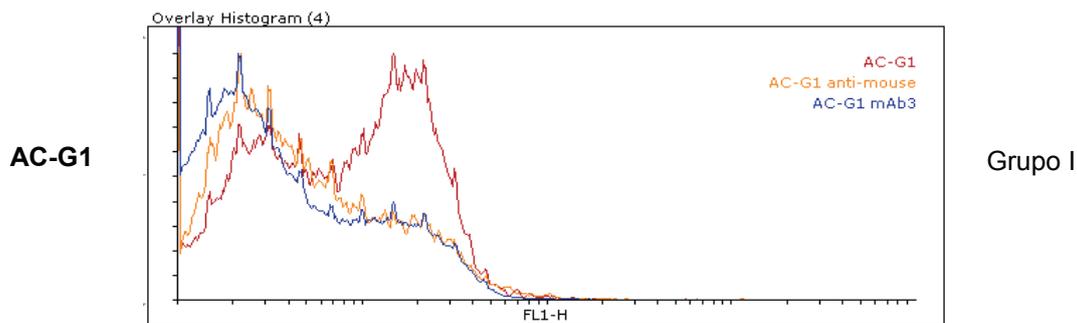


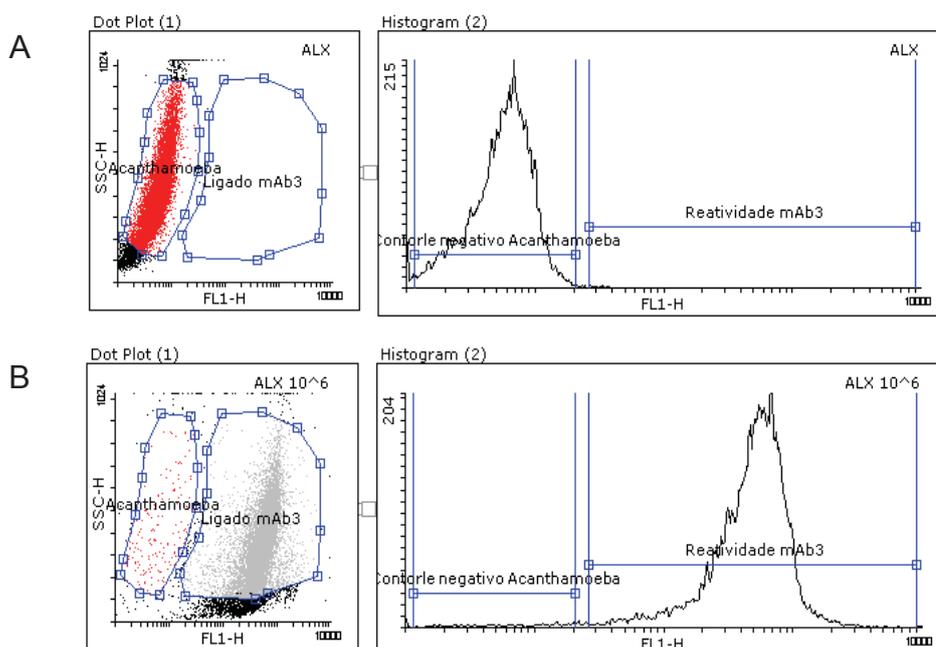
FIGURA 10: HISTOGRAMA EVIDENCIANDO A REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE A DIFERENTES ISOLADOS DE *Acanthamoeba* sp. POR CITOMETRIA DE FLUXO. Emissão da fluorescência dos diferentes trofozoítos de *Acanthamoeba*, em vermelho, fluorescência dos diferentes trofozoítos de *Acanthamoeba* frente ao mAb3 (125 μ mL) em azul e fluorescência dos diferentes trofozoítos de *Acanthamoeba* frente a ALEXA flúor $\text{\textcircled{R}}$ 488 goat anti-mouse IgG [H+L] (1:300), em amarelo. **Fonte:** a autora (2017).

TABELA 2: MÉDIA DA REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE A DIFERENTES ISOLADOS, POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Isolado	Média (fluorescência frente à <i>Acanthamoeba</i>)	Média (isolados na presença de mAb3)	Média (isolados na presença de ALEXA flúor 488)
ALX	40,68	523,30	76,35
AP2	44,11	582,94	46,14
AR14	46,98	50,03	50,48
AR15	47,40	70,41	50,94
LG	44,91	61,53	42,17
R2P5	40,32	53,28	47,40
AC-G1	41,79	42,17	46,98

Fonte: a autora (2017).

Para determinar a quantidade mínima de trofozoítos capazes de serem detectados pelo mAb3 (125 μ mL) diferentes concentrações foram avaliadas (1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 e 1×10^3) (FIGURA 11 e TABELA 3).



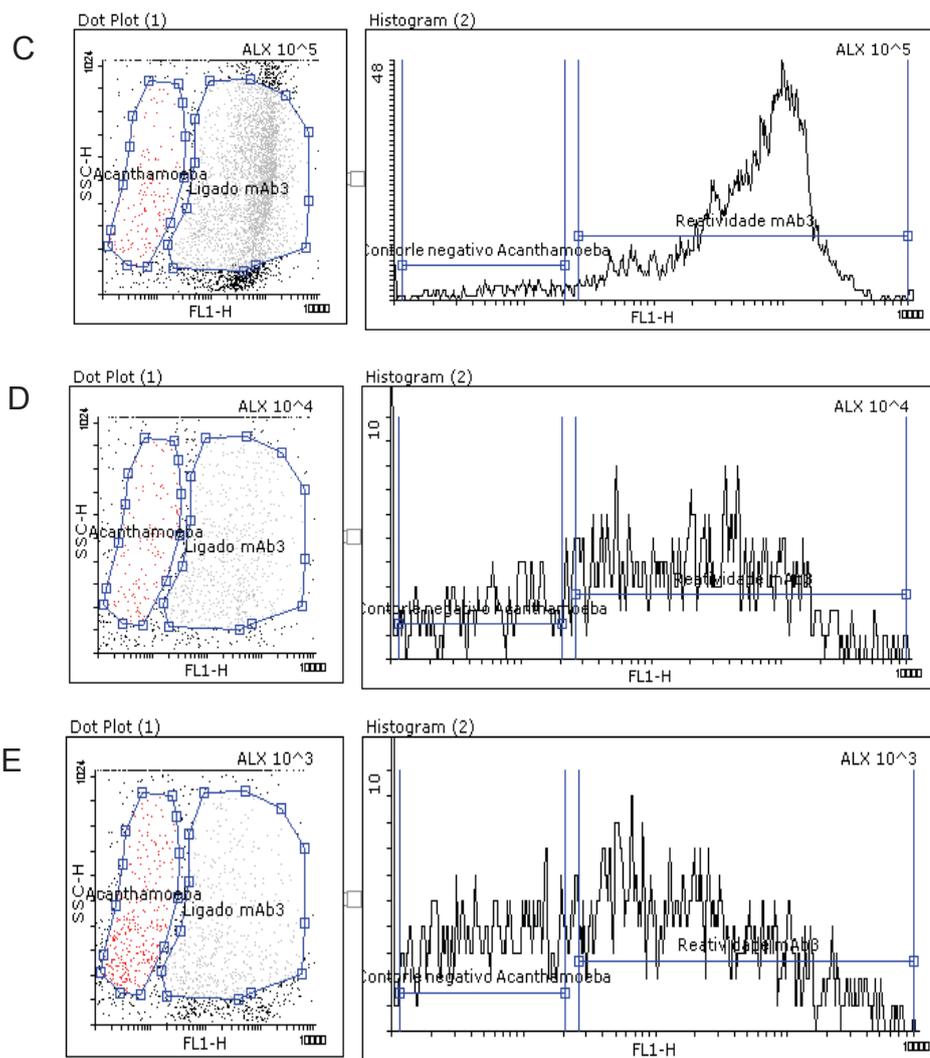


FIGURA 11: HISTOGRAMA DA QUANTIDADE MÍNIMA DE TROFOZOÍTOS FRENTE AO mAb3, AVALIADO POR CITOMETRIA DE FLUXO. (A) 1×10^6 , (B, C, D e E) 1×10^5 , 1×10^4 e 1×10^3 frente a $125 \mu\text{mL}$ de mAb3, respectivamente. **Fonte:** a autora (2017).

TABELA 3: MÉDIA DA REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE A DIFERENTES QUANTIDADES DE CÉLULAS, POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Trofozoítos (ALX)	Média
1×10^6 *	5,88
1×10^5	513,97
1×10^4	615,27
1×10^3	91,40
1×10^2	47,83

*Apenas ALX, controle negativo de reatividade. **Fonte:** a autora (2017).

Imayasu et al., (2013) utilizaram citometria de fluxo para detecção da viabilidade e encistamento de *Acanthamoeba*. Flores e colaboradores (1990) diferenciaram espécies de *Acanthamoeba* e *Naegleria fowleri* utilizando anticorpos monoclonais por citometria de fluxo. Eles utilizaram 1 mg/mL de anticorpo monoclonal 1×10^6 trofozoítos. Turner et al. (2005) produziram

anticorpos para utilizar no reconhecimento de cepas do gênero de *Acanthamoeba*. Os autores relatam que alguns anticorpos produzidos podem ser utilizados no diagnóstico por citometria de fluxo, porém os anticorpos foram capazes de identificar apenas a fase cística. Borazjani et al., (2000) utilizaram a citometria de fluxo para determinar a eficácia das diluições de desinfecção da lente de contato.

Anticorpos para fins de diagnóstico contra ceratite amebiana já foram relatados (Epstein et al., 1986). O teste de diagnóstico por imunofluorescência indireta tem sido utilizado para detectar ameba em raspagem da córnea ou em tecido de biópsia. Nesse estudo mesmo em baixas concentrações de *Acanthamoeba* 1×10^4 e 1×10^3 trofozoítos/mL, houve reatividade do mAb3. Sendo assim, acredita-se que este anticorpo possa, futuramente, ser empregado em diferentes testes de imunodiagnóstico, com base em seu potencial de reconhecimento específico e afinidade.

JENSON et al. (1998) e KAO et al. (2001) citam algumas vantagens da citometria de fluxo em comparação com a imunofluorescência. A citometria pode ser mais objetiva, rápida e reprodutível, permitindo também a identificação de outras populações (infecções mistas). A citometria de fluxo apresenta maior sensibilidade, em níveis de expressão proteica menores, provavelmente devido à dificuldade de identificação visual, apesar da experiência do técnico. Marjanovic et al. (2014) relata que a intensidade de fluorescência é maior em citometria de fluxo se comparada com outras técnicas. Apesar de Valdez et al. (1997), Kao et al. (2001), Power et al. (2003), e Dixon et al. (2005) citarem a citometria de fluxo uma técnica rápida e sensível para detectar a presença de uma variedade de parasitos em amostras de seres humanos e animais Uehlinger et al. (2008) comentam que a imunofluorescência para detecção de *Giardia duodenalis* em bovinos foi mais sensível que a citometria de fluxo, mas mesmo assim argumentam que citometria poderia ser aplicada como uma ferramenta de triagem rápida.

Tunicamicina é um inibidor de N-glicosilação, sendo assim a tunicamicina foi utilizada em cultivo para determinar se o alvo do mAb3 era influenciado por N-glicosilações. A citometria de fluxo foi realizada com 1×10^6 trofozoítos, frente a 125 µg/mL de mAb3 e 1:300 de ALEXA flúor 488 *goat anti-mouse* IgG [H+L], na presença ou não de trofozoítos cultivados a 72 h com

tunicamicina (10 µg/mL) (FIGURA 12 e TABELA 3). Pode-se observar que o alvo do mAb3 apresenta provavelmente N-glicosilações, pois o pico do histograma mostra-se distinto quando cultivado na presença do inibidor.

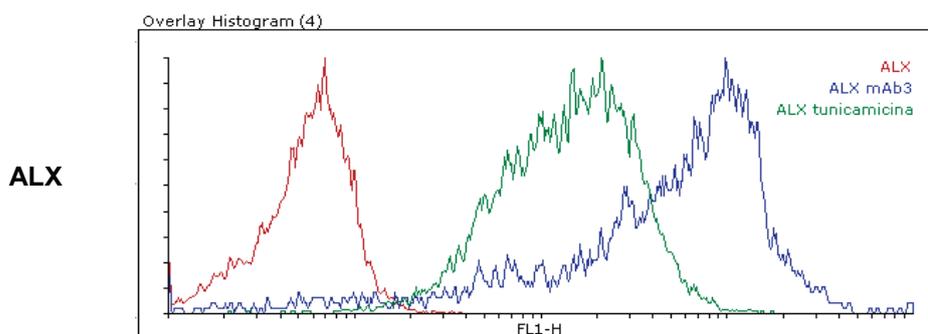


FIGURA 12: HISTOGRAMA DEMONSTRANDO A INFLUÊNCIA DA TUNICAMICINA EM RELAÇÃO AO RECONHECIMENTO DO mAb3 POR CITOMETRIA DE FLUXO. Emissão da fluorescência emitida pelo isolado ALX a 1×10^6 trofozoítos/mL, em vermelho, fluorescência emitida pelo reconhecimento do mAb3 (125 µ/mL), em azul, e emissão da fluorescência emitida por mAb3 após o tratamento de ALX com tunicamicina (10 µg/mL), em verde. **Fonte:** a autora (2017).

TABELA 4: INFLUÊNCIA DA TUNICAMICINA PELO RECONHECIMENTO DO mAb3.

Isolado	Média	Média na presença de mAb3	Média do isolado com influência de tunicamicina 48 h
ALX	5,88	615,27	148,55

Fonte: a autora (2017).

Desde 1984, Zola e colaboradores descrevem a capacidade da análise das propriedades químicas e bioquímicas das moléculas de membrana por citometria de fluxo com anticorpos monoclonais, podendo determinar se o antígeno proteico possui glicosilação ou não, através da inibição de N-glicosilações com a tunicamicina. Sendo possível determinar diferenças no padrão de massa molecular, ponto isoelétrico da proteína alvo e determinar se o carboidrato está envolvido no epítipo ou é o antígeno predominante. Réveiller et al. (2000), também utilizaram tunicamicina para determinar se o alvo do anticorpo monoclonal, mAb5D12, anti-*Naegleria fowleri* era influenciado por N-glicosilações, e foi determinado que o alvo antigênico possuía componente polissacarídeo. Chen e colaboradores ao tratarem células humanas tumorais com tunicamicina puderam indicar que o antígeno 4Ig-hB7H3, reconhecido pelo anticorpo monoclonal mAb376.96, associado a regulação, migração e invasão de células tumorais, possui uma proteína de

membrana glicosilada (CHEN et al., 2008). Em 2016 Wanssok e colaboradores também utilizaram tunicamicina para determinar as propriedades bioquímicas de anticorpos como o mAbCOS3A, através de técnicas como WB e citometria de fluxo. Igualmente, outros autores vêm utilizando a tunicamicina para avaliar a expressão de antígenos glicosilados de importância biológica Ramirez et al. (1993), Yousuf et al. (2010), Liu et al. (2016) e Kang et al. (2017).

5.1.5 Purificação do alvo do mAb3 por imunoprecipitação e análise por espectrometria de massa (MS)

Ensaio de imunoprecipitação do antígeno de *Acanthamoeba* sp. (AP2) permitiram a purificação de antígenos específicos reconhecidos pelo mAb3. As amostras eluídas por imunoprecipitação foram submetidas a análises por ELISA, eletroforese, WB e espectrometria de massa. Foi possível avaliar a eficiência da purificação e o reconhecimento das proteínas pelo mAb3 (FIGURA 13 a; b; c).

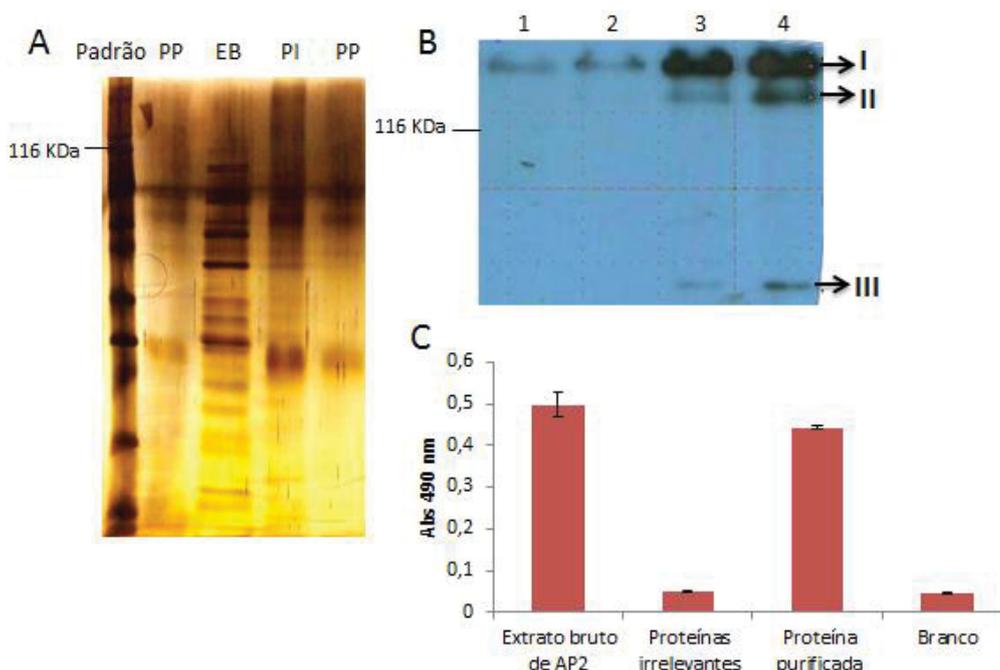


FIGURA 13: REATIVIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL CONTRA ANTÍGENOS PURIFICADOS DE *Acanthamoeba* sp., POR WESTERN BLOTTING E ELISA. O extrato bruto (EB) do isolado de *Acanthamoeba* sp. (AP2), as proteínas purificadas pelo anticorpo mAb3 (PP) e outras proteínas sem especificidade (PI), foram corridas por eletroforese SDS-PAGE (A). As etapas de purificação (1, 2, 3 e 4), realizadas por Imunoprecipitação, foram avaliadas por *Western blotting* (B) onde I, II e III são as proteínas correspondentes ao purificado. A reatividade da proteína purificada também foi avaliada por ELISA (C). A imuno-reatividade do anticorpo monoclonal mAb3, na concentração de 1,5 µg/mL, foi avaliada frente aos antígenos específicos e não específicos por *Western blotting* (B) e por ELISA (C), sendo adsorvido a placa 5 µg/mL de antígeno. **Fonte:** a autora (2017).

A análise por espectrometria de massa com base nas amostras excisadas (indicadas na FIGURA 12 b) foram correlacionadas ao banco de dados de *Acanthamoeba* e sugerem que a proteína I pode corresponder a uma proteína putativa com atividade de chaperona. No NCBI está depositada com o número de acesso (geneID) "XP_004340262.1" e no AmoebaDB "ACA1_369850". Esta proteína contém motivos AAA (atividade ATPásica), motivos *Walker* (característico de proteínas ligadoras de ATP), motivo ClpB (função chaperonina relacionada com resolubilização de agregados proteicos) e motivo RILP (Rab que interage com lisossomos). Já a proteína II indica para uma actina, número de acesso no NCBI "XP_004352077.1" e no AmoebaDB "ACA1_036280". Enquanto que a proteína III poderia ser uma proteína hipotética que não contém nenhum domínio conservado e nem com arquitetura de domínio similar a outros domínios. Quantidade de íntrons muito grande nesta proteína NCBI "gb|ELR17008.1|", AmoebaDB "ACA1_002500".

No entanto, quando realizado a identificação "*de novo*" por espectrometria de massa usando os peptídeos mais abundantes, as três identificações sugerem a presença de peptídeos presentes numa proteína de membrana transportadora de cátion monovalente (CPA2, *antiporter*). Corresponde a uma família de transportadores pertencentes à superfamília CPA. São encontradas em bactérias, arqueias e eucariontes (HEALY et al., 2014). Com base nos resultados apresentados na imunofluorescência (BECKER-FINCO et al., 2012) e citometria de fluxo empregando-se o mAb3 frente aos trofozoítos de *Acanthamoeba* não permeabilizados, sugere-se que componentes de membrana sejam os principais candidatos para o reconhecimento do mAb3.

Entre os membros funcionalmente bem caracterizados nesta família de transportadores estão as KefB/KefC, proteínas de efluxo em *E. coli* capazes de catalisar o *antiporter* K^+/H^+ (HEALY et al., 2014), *antiporter* Na^+/H^+ em *Enterococcus hirae* (WASER et al., 1992) e *antiporter* K^+/H^+ em *S. cerevisiae* (ALBUQUERQUE et al., 2008).

Esse sistema de efluente de potássio, pela proteína Kef, protege as bactérias contra efeitos prejudiciais dos compostos eletrófilos via acidificação do citoplasma. O Kef é inibido pela glutathiona (GSH), mas é ativado por

conjugados de glutathione-S (GS-X) formados na presença de eletrofilos. GSH e GS-X ligam-se em locais sobrepostos a Kef, que estão localizados em um domínio regulador citosólico (FUJISAWA et al., 2007; ROOSILD et al., 2010; HEALY et al., 2014) (FIGURA 14).

Estas proteínas são importantes para a sobrevivência celular durante a exposição a metabolitos tóxicos, possivelmente porque podem libertar K^+ , permitindo a absorção de H^+ modulando o pH citoplasmático (FUJISAWA et al., 2007; ROOSILD et al., 2010; HEALY et al., 2014).

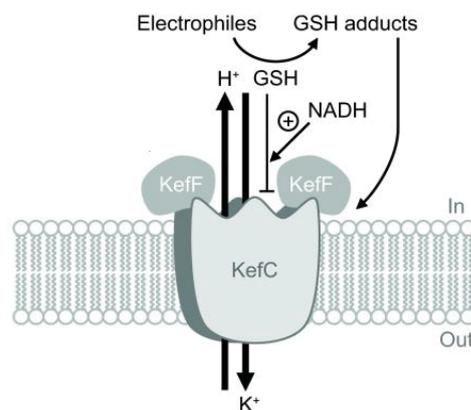


FIGURA 14: FIGURA REPRESENTATIVA DA PROTEÍNA DE MEMBRANA TRANSPORTADORA DE CÂTION MONOVALENTE (CPA2, *ANTI PORTER*). Proteína KefFC um antiporter K^+/H^+ . A atividade *antiporter* é inibida por glutathione (GSH). A inibição do *transporter* pela glutathione GSH é reforçada por NADH. Os eletrófilos liberam a inibição de GSH, e os adutos formados entre GSH e os eletrófilos podem ativar *antiporter*. **Fonte:** Adaptado por Fujisawa et al., (2007).

Há vários trabalhos descritos relatando a existência de proteínas de membrana transportadoras de cátions e sua importância. Hori e colaboradores (2013) identificaram e caracterizaram transportadores K^+ codificados por genes Kup de *Legionella pneumophila*, causadora de pneumonia grave. Bactéria capaz de replicar-se dentro de macrófagos e *Acanthamoeba*. Ferhat et al. (2009) também relataram a presença de proteínas transportadoras (Tolc) em *Legionella pneumophila*, importantes no efluxo de várias moléculas, como medida de resistência a várias drogas e invasão ao hospedeiro. Wojtkowska e colaboradores (2012) fizeram uma análise filogenética dos canais de membrana B-barrel presentes nas mitocôndrias. O transporte moléculas através da membrana externa da mitocôndria é fundamental para sua função. Proteínas de desacoplamento (UCPs) são membros da família de proteínas transportadoras de ânions mitocondriais, foi demonstrado presença dessas proteínas também em alguns eucariotos unicelulares incluindo *Acanthamoeba*

castellanii, primeiro eucarioto unicelular identificado com este tipo de proteína (JARMUSZKIEWICZ et al., 2009).

Proteína de membrana transportadora de cátion monovalente foi descrita também em *Mycobacterium smegmatis* gene MSMEG_6769 (MOHAN et al., 2015), *Tetrahymena thermophil* gene THERM_0051527, com função de transporte de íon potássio e sódio e regulação intracelular do pH (EISEN et al., 2006), *Staphylococcus aureus* gene SAUSA300_0911, transporte do íon potássio, cepa resistente a vários fármacos (DIEP et al., 2006) *Paenibacillus terrae* gene HPL003_05630 (SHIN et al., 2012), *Synechococcus* sp. gene napA e CYA_0923, resposta para estresse (BHAYA et al., 2007).

Todos esses achados na literatura sobre essa família de transportadores (CPA2) observada em outros organismos sugere que, em *Acanthamoeba*, ela possa atuar como parte de um mecanismo adaptativo às condições de vida parasitária, que demandaria maior resistência ao estresse oxidativo causado por células na defesa do hospedeiro. Sugerindo também que a presença aumentada destas proteínas pode estar relacionada com o maior potencial de patogenicidade apresentado por alguns trofozoítos de *Acanthamoeba*.

5.2 ENSAIO DE LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO

Primeiramente analisamos a curva de crescimento das formas trofozoítas dos diferentes isolados de *Acanthamoeba*. Com o intuito de conhecer o crescimento dos isolados e momento adequado para emprego dos parasitos nos ensaios de lise mediado pelo sistema complemento.

O perfil de crescimento das amebas foi avaliado pela incubação dos isolados em meio PYG. Todos apresentaram como característica um aumento da proliferação entre 24 a 72 h, sendo este o maior ponto de crescimento. A partir deste ponto começam a aparecer cistos e o crescimento é reduzido. Os isolados possuem padrões de crescimento diferenciados. O isolado LG apresentou a maior capacidade de replicação, já o isolado AP2 a menor (FIGURA 4).

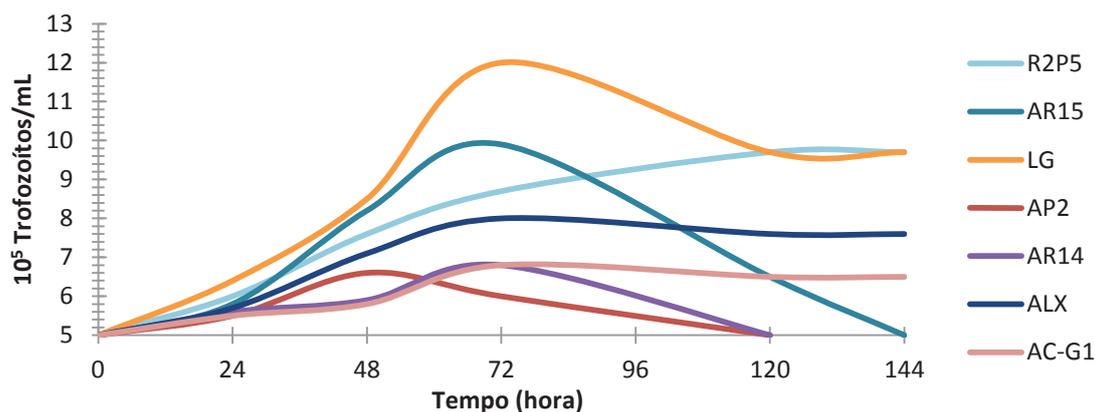


GRÁFICO 4: CINÉTICA DE CRESCIMENTO DOS DIFERENTES ISOLADOS DE *Acanthamoeba*. Curva de crescimento comparando densidade total amebiana. Amebas dos 7 isolados foram coletadas a uma densidade de 10^5 trofozoítos/mL, em meio PYG. As amebas foram coletadas e quantificadas usando uma câmera de Neubauer. **Fonte:** a autora (2017).

De acordo com gráfico usamos parasitas com 48 h, depois do início da curva, para garantir que estariam em fase logarítmica, antes de atingirem a fase estacionária (72 h).

Avaliamos as diferenças na sensibilidade dos 7 isolados de trofozoítos a lise mediada pelo complemento, variando as concentrações de soro (50; 25; 12,5 e 0%) em 30 min. Desta maneira foi determinado em alguns isolados a dose letal 50, que corresponde a concentração de soro capaz de produzir 50% de morte nos parasitas (DL 50). Observa-se que os 7 isolados apresentam diferenças na sensibilidade ao soro normal humano, sendo AP2 e ALX mais suscetíveis à morte pelo complemento, enquanto, AC-G1, AR15 e R2P5 apresentam menor morte pelo SC (GRÁFICO 5).

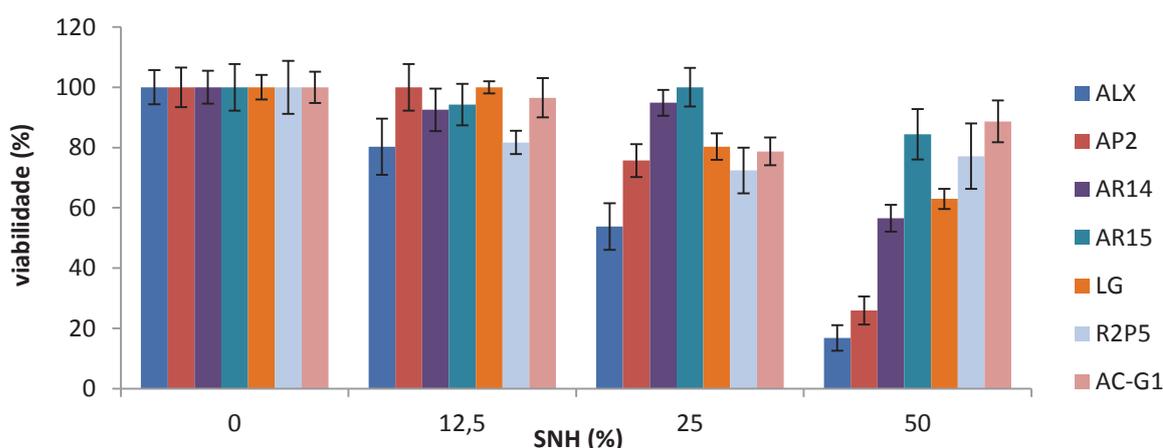


GRÁFICO 5: LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO EM DIFERENTES ISOLADOS DE *Acanthamoeba* sp. O ensaio da cinética do complemento mediada por lise dos parasitas (ALX, AP2, AR14, AR15, LG, R2P5 e AC-G1) foi avaliada contra diferentes concentrações de SNH (0; 12,5; 25 e 50%). Determinando uma dose letal em que matasse 50% dos trofozoítos para pelo menos um dos isolados. A lise do complemento foi realizada por 30 min a 37°C. **Fonte:** a autora (2017).

De acordo com a diferença nas susceptibilidades ao SNH (GRÁFICO 5) decidimos escolher os isolados que são mais sensíveis ao complemento (ALX e AP2) e os mais resistentes (R2P5 e AC-G1) para serem melhores avaliadas ao longo do tempo e na presença ou não de EGTA e Mg, condição que inibe as vias clássica e das lectinas (dependentes de Ca) e potencia a via alternativa (independente de Ca e Mg dependente) (GRÁFICO 6 a; b). Pode-se observar que a lise do complemento é dependente do tempo e que a presença de EGTA e Mg resultou em uma maior ativação do SC, ou seja, quando há inibição das vias clássica e das lectinas, a via alternativa torna-se mais intensa, devido a possibilidade de existir alguma inibição da via alternativa, quando existe associação das três vias presentes e/ou a via alternativa pode ter sido mais ativada pela presença do cofator Mg (GRÁFICO 6 a; b).

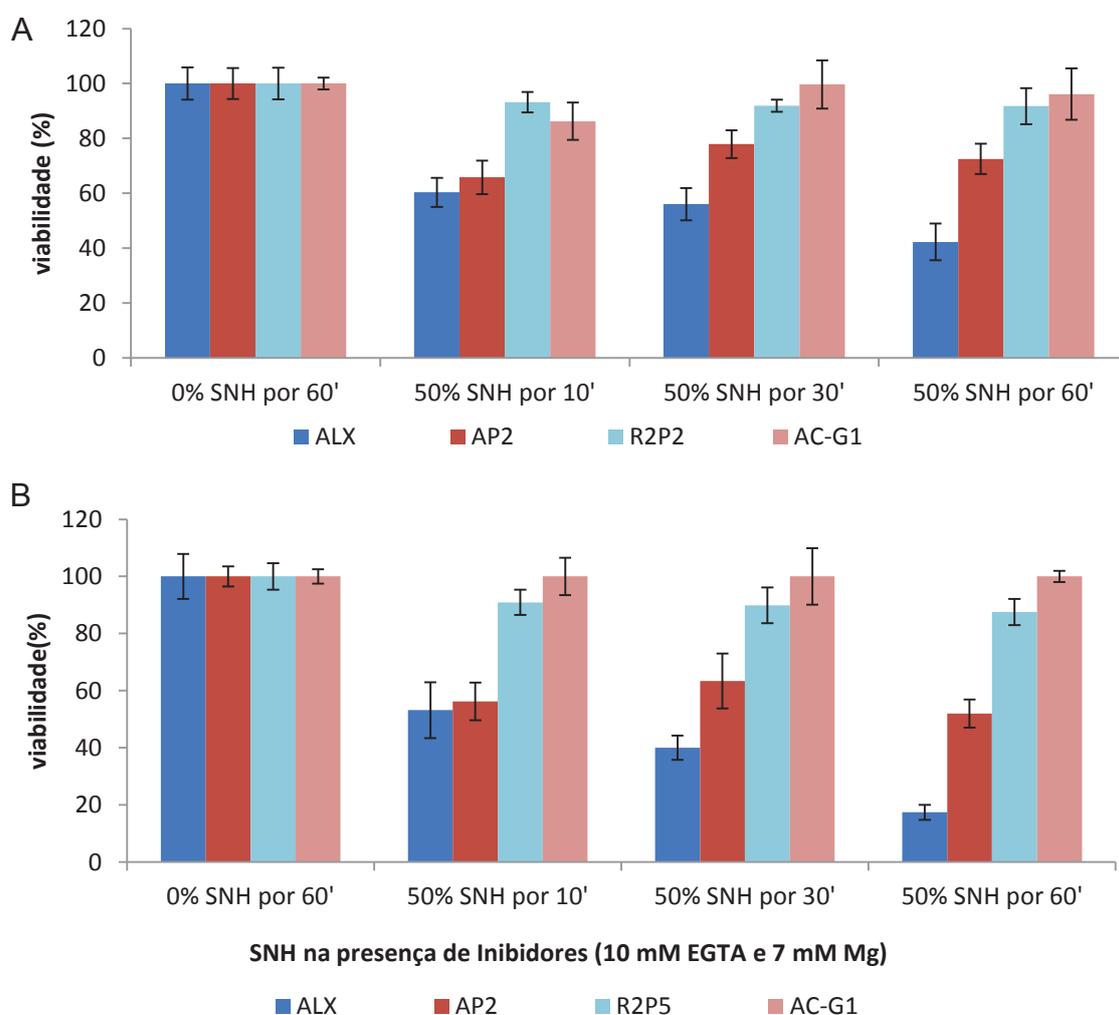


GRÁFICO 6: ANÁLISE DA LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO DE DIFERENTES ISOLADOS DE *Acanthamoeba* sp. O ensaio foi realizado com uma dose letal do SNH (50%) em diferentes tempos de incubação (10, 30 e 60 min) na presença ou não de EGTA e Mg. **Fonte:** a autora (2017).

Posteriormente para avaliar a possível influência de açúcares N-ligados na ativação do SC foi utilizada tunicamicina, um análogo de dholicol fosfato que bloqueia a transferência de açúcares N-ligados às proteínas parasitárias da célula alvo realizada pelo dholicol. Para isto foram escolhidos os isolados AP2, por ser referência de patogenicidade e com maior reconhecimento pelo mAb3 e R2P5 por ser menos reconhecido.

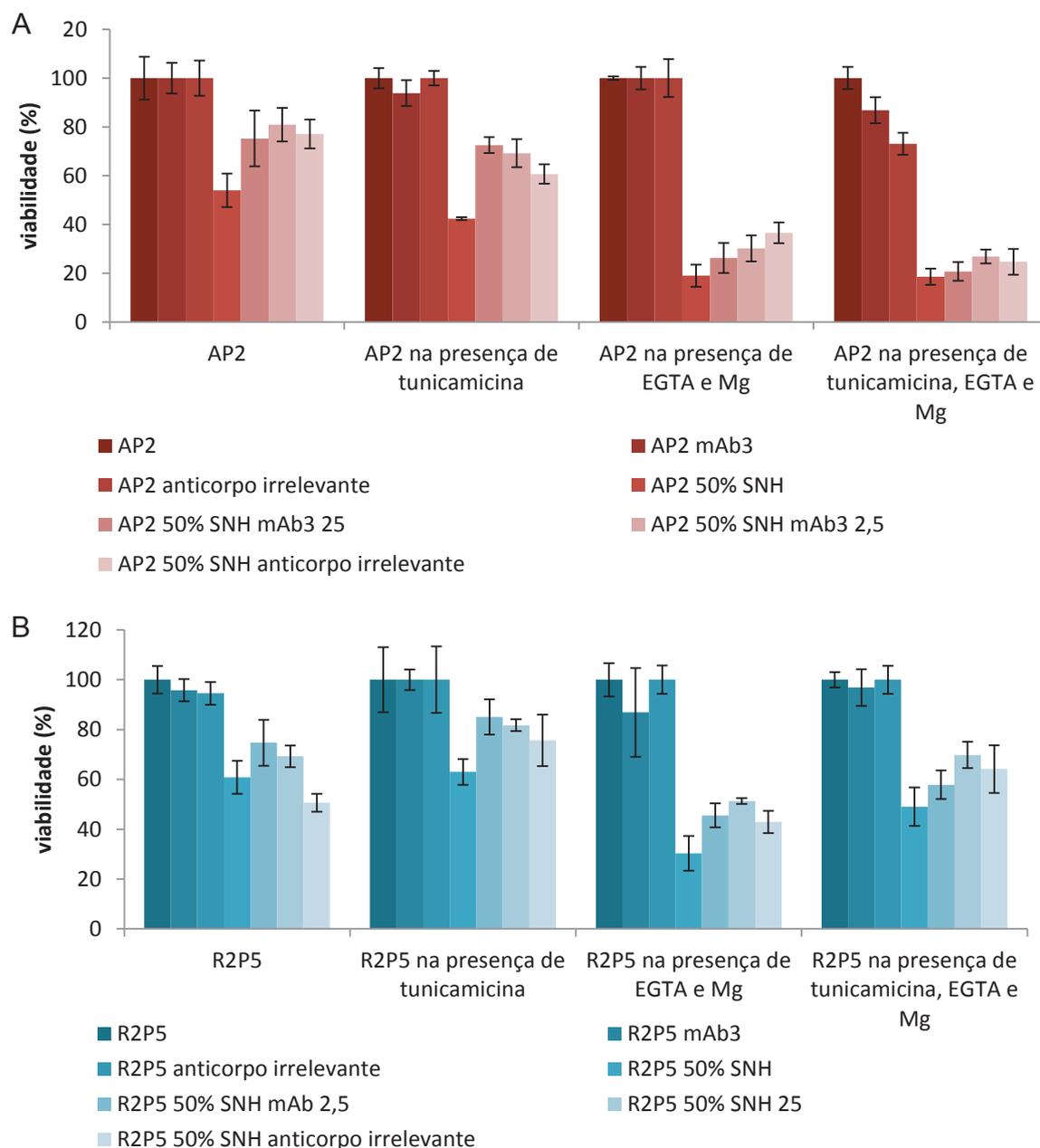


GRÁFICO 7: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA TUNICAMINA NA ATIVAÇÃO COMPLEMENTO. O ensaio foi realizado com uma dose letal de SNH (50%), após 60 min de incubação a 37°C, na presença ou não de EGTA, Mg e tunicamicina para os trofozoítos de AP2 (A) e R2P5 (B).
Fonte: a autora (2017).

No gráfico 7 podemos observar que o isolado AP2 na presença de tunicamicina, ou seja, com a inibição de N-glicosilados, apresentou um pequeno aumento da susceptibilidade a lise mediada pelo complemento ao contrário do observado para R2P5. Isso indicaria que as proteínas N-glicosiladas de AP2 poderiam estar bloqueando a ativação do complemento e desta maneira diminuindo a morte celular. Na presença da tunicamicina essas proteínas N-glicosiladas estão inibidas ocorrendo o acesso ou a liberação para a ativação do SC. Já para R2P5 indicaria que as proteínas N-glicosiladas serviriam como sinalizadores para lise mediada pelo complemento.

Ao utilizar o mAb3 nos ensaios, pode-se observar que o mesmo apresentou uma proteção aos trofozoítos. Porém, um anticorpo irrelevante também apresentou proteção celular. Sendo assim, mais estudos precisam ser realizados.

Marciano-Cabral e colaboradores (1988), também relataram diferenças de lise mediada pelo complemento em diferentes cepas, indicando que as espécies possam utilizar vários mecanismos para resistir à morte ativada pelo SC, porém essas diferenças e conhecimento exato do mecanismo ainda precisam ser melhor compreendidos. Outros autores (PUMIDONMING et al., 2011) sugerem que não existem diferenças entre a ativação do sistema complemento entre cepas.

Como sugerido por Pumidonming et al. (2011) nossos resultados indicaram que a via alternativa é ativada pelo complemento, quando em contato com soro. Ainda segundo esses autores, foi observado que, ao adicionar soro de rato depletado de C1qa -/- e MBL-A/C -/-, houve a ligação de C3b, determinando a ativação da via alternativa e na presença de Bf/C2 -/- depletado, não houve a ligação de C3b, como consequência sem a ativação da via alternativa. Grandes quantidades de C3 e fator B e baixas quantidades de C1q foram observadas nas lágrimas, indicando que a ativação da via alternativa é predominante no sistema ocular (WILLCOX et al., 1997).

A maior suscetibilidade ao SC apresentada pelas amostras com maior potencial patogênico dever ser mais bem investigada. Possíveis explicações poderiam ser aventadas: a presença de mediadores do SC poderia facilitar a adesão e efeito patogênico no microambiente da infecção (SCHNEIDER et al., 2006; KUGELBERG et al., 2008, FERREIRA et al., 2010; TORDELLO et al.,

2014; LAVENDER et al., 2017; MIHÁLY, 2017) o sistema imune no olho, que é considerado um tecido imune privilegiado, pode apresentar características específicas que favorecem a permanência do patógeno e a não ativação persistente do sistema do complemento (ABBAS, 2015) ou ainda um mecanismo tardio de inibição da ativação do sistema do complemento.

No que concerne o mAb3, o anticorpo poderia desempenhar alguma função biológica em relação a ativação ou não do complemento, assim como outras funções. Villemez et al. (1985), por exemplo, demonstraram que os anticorpos produzidos estimulavam algumas diferenciações celulares como a inibição de pinocitose e estimulação ao encistamento. Quanto ao mAb3, mais estudos ainda precisam ser realizados para confirmar se exercem algum papel no SC ou em outra função.

6 CONCLUSÕES

Foi possível verificar que o anticorpo monoclonal mAb3, assim como descrito em 2012 por Becker-Finco e colaboradores, é capaz de reconhecer antígenos presentes na cepa AP2 de *Acanthamoeba*, que é sabidamente patogênica e não reconheceu antígenos na cepa AP4 que não é patogênica. Essa especificidade foi também confirmada, por teste de ELISA, WB e citometria de fluxo, e em novos isolados com potencial patogênico (ALX, LG, AR15, AR14 e R2P5), mas não para o isolado AC-G1 que é uma *Acanthamoeba* do grupo I, não associado à patogenicidade, ou outros organismos, os principais causadores de ceratite fúngica. Sugerindo assim, uma variação no perfil de reconhecimento, que pode estar associado com o potencial patogênico de cada amostra e confirmando a potencialidade do emprego deste anticorpo na identificação de infecções.

Foi possível identificar uma pequena quantidade de amostra de trofozoítos, pelo mAb3, por citometria de fluxo, demonstrando uma alta sensibilidade do anticorpo. Dessa forma, a detecção de um pequeno número de trofozoítos (10×10^3) pela citometria de fluxo indicou que com o mAb3, seria possível promover melhorias quanto à sensibilidade e tempo de execução nos testes atualmente empregados para identificação de isolados potencialmente patogênicos.

O reconhecimento da proteína alvo apresenta influência, na identificação pelo mAb3, após a inibição com tunicamicina, sugerindo que a proteína de interesse apresenta regiões com N-glicosilações.

Uma análise prévia da identificação da proteína alvo por espectrometria de massa sugere que seja uma proteína de membrana transportadora de cátion monovalente (CPA2, *antiporter*). Porém, um estudo mais completo com mais isolados e controles precisam ser realizados para confirmar o achado.

Diferenças importantes foram observadas quanto à capacidade dos diferentes isolados (AP2, ALX, LG, AR15, AR14, R2P5 e AC-G1) ativarem o sistema complemento. As amostras de *Acanthamoeba* com maior reconhecimento pelo mAb3 foram mais suscetíveis a morte, sugerindo que o alvo de reconhecimento possa estar envolvido de alguma forma na ativação do complemento. A via alternativa foi mais ativa quando as vias da Lectina e

Clássica foram inibidas, sugerindo que na presença das três vias poderia existir algum efeito inibidor da via alternativa. Porém, mais estudos envolvendo a ativação do sistema complemento precisam ser realizados para elucidar esse mecanismo.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas pretende-se avaliar a capacidade de detecção do mAb3 em lágrimas provenientes de pacientes com CA, por citometria de fluxo;

Melhorar a sensibilidade da Citometria de Fluxo através da biotinição do mAb3;

Confirmação do alvo do mAb3 com um estudo mais completo incluindo outros isolados e controles;

Clonar e expressar a proteína alvo do mAb3 para avaliar em ensaios futuros sua possível função biológica;

Após confirmação da proteína, pretende-se clonar e expressar a proteína alvo do mAb3 para avaliar em ensaios futuros sua possível função biológica;

Confirmar sensibilidade ao SC com mais estudos, inibidores e outros anticorpos irrelevantes;

Realizar ensaio *in vivo* da ativação do SC para elucidar possível mecanismo de infecção e patogenicidade amebiana.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8 ed., 2015.

ABCAM®. *Crosslinking Protocol – Procedure for crosslinking the antibody to the beads* Abcam®. Disponível em: <<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/crosslinking.pdf>>. Acesso em: 20 ago 2016.

AKSOZEK, A.; MCCLELLAN, K.; HOWARD, K.; NIEDERKORN J. Y.; ALIZADEH, H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 621-623, 2002.

ALBUQUERQUE, C. P.; SMOLKA, M. B.; PAYNE, S. H.; BAFNA, V.; ENG, J.; ZHOU H. A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7(7), p. 1389-1396, 2008.

ALIZADEH, H.; TRIPATHI, T.; ABDI, M.; SMITH, A. D. Pathogenic strains of *Acanthamoeba* are recognized by TLR4 and initiated inflammatory responses in the cornea. **PLoS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.

ALKHARASHI, M.; LINDSLEY, K.; LAW, H. A.; SIKDER, S. Medical interventions for *Acanthamoeba* keratitis. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.2, p. 2-28, 2015.

ALVARENGA, L. S.; FREITAS, D.; HOFLING-LIMA, A. L. Ceratite por *Acanthamoeba*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.63 n.2, p.155-159, 2000.

ARMSTRONG, M. The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 2, p. 65-73, 2000.

BALCZUN, C.; SCHEID, P. L. Free-living amoebae as hosts and vectors of intracellular microorganisms with public health significance. **Viruses**, v. 9 (4), p. 1-18, 2017.

BECKER-FINCO, A.; COSTA, A. O.; SILVA, S. K.; RAMADA, J. S.; FURST, C.; STINGHEN, A. E.; DE FIGUEIREDO, B. C.; DE MOURA, J.; ALVARENGA, L. M. Physiological, morphological, and immunochemical parameters used for the characterization of clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*. **Parasitology First View**, p. 1-10, 2012.

BERGER, P.; PAPAZIAN, L.; DRANCOURT, M.; LA SCOLA, B.; AUFRAY, J. P.; RAOULT, D. Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 12, p. 248-255, 2006.

BHAYA, D.; GROSSMAN, A. R.; STEUNOU, A. S.; KHURI, N.; COHAN F. M.; HAMAMURA, N.; MELENDREZ, M. C.; BATESON, M. M.; WARD, D. M.; HEIDELBERG, J. F. Population level functional diversity in a microbial community revealed by comparative genomic and metagenomic analyses. **The ISME Journal**, v. 1(8), p. 703-13, 2007.

BORAZJANI, R. N.; MAY, L. L.; NOBLE, J. A.; AVERY, S. V.; AHEARN, D. G. Flow cytometry for determination of the efficacy of contact lens disinfecting solutions against *Acanthamoeba* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66(3), p.1057–1061, 2000.

CARNT, N.; MONTANEZ, V. M.; GALATOWICZ, L.; VELI, N.; CALDER, V. Tear cytokine levels in contact lens wearers with *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea**, v. 36 (7), p. 791-798, 2017.

CARNT, N.; STAPLETON, F. Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: a review. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v. 36, p. 77-92, 2016.

CHEN, Y. W.; TEKLE, C.; FODSTAD, O. The immunoregulatory protein human B7H3 is a tumor-associated antigen that regulates tumor cell migration and invasion. **Current Cancer Drug Targets**, v. 8(5) p. 404-413, 2008.

CLARKE, D. W.; ALIZADEH, H.; NIEDERKORN, J. Y. Failure of *Acanthamoeba castellanii* to produce intraocular infections. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v 46 (7), p. 247-248, 2005.

CLARKE, D. W.; NIEDERKORN, J. Y. The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1400-1405, 2006.

COPE, J. R.; COLLIER, S. A.; SCHEIN, O. D.; BROWN, A. C.; VERANI, J. R.; GALLEN, R.; BEACH, M. J.; YODER, J. S. *Acanthamoeba* keratitis among rigid gas permeable contact lens wearers in the United States. **Ophthalmology**, v. 123, p. 1435-1441, 2016.

CORSARO, D.; WALOCHNIK, J.; KOHSLER, M.; ROTT, M. B. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). **Parasitology Research**, v. 114, 2481-2490, 2015.

COSTA, A. O.; CASTRO, E. A.; FERREIRA, G. A.; FURST, C.; CROZETA, M. A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Characterization of *Acanthamoeba* isolates from dust of a public hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 57(1), p. 70-5, 2010.

COSTA, A. O.; FURST, C.; ROCHA, L. O.; CIRELLI, C.; CARDOSO, C. N.; NEIVA, F. S.; POSSAMAI, C. O.; DE ASSIS SANTOS, D.; THOMAZ-SOCCOL, V. Molecular diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis: evaluation in rat

model and application in suspected human cases. **Parasitology Research**, v. 116 (4), p. 1339-1344, 2017.

DAAS, L.; VIESTENZ, A.; SCHNABEL, P.; FRIES, F. N.; HAGER, T.; SZENTMÁRY, N.; SEITZ, B. Confocal microscopy in *Acanthamoeba* keratitis as an early relapse-marker. **Clinical Anatomy**, 2017.

DART, J. K.; SAW, V. P.; KILVINGTON, S. *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update. **American Journal of Ophthalmology**, v. 148, p. 487-499, 2009.

DERDA, M.; SOLARCZYK, P.; CHOLEWINSKI, M.; HADAS, E. Genotypic characterization of amoeba isolated from *Acanthamoeba* keratitis in Poland. **Parasitology Research**, v.114, 1233-1237, 2015.

DERDA, M.; WOJTKOWIAK-GIERA, A.; KOLASA-WOLOSIUK, A.; KOSIK-BOGACKA, D.; HADAS, E.; JAGODZINSKI, P. P.; WANDURSKA-NOWAK, E. *Acanthamoeba* infection in lungs of mice expressed by toll-like receptors (TLR2 and TLR4). **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 30-34, 2016.

DIXON, B. R.; BUSSEY, J. M.; PARRINGTON, L. J.; PARENTEAU, M. Detection of *Cyclospora cayentanensis* oocysts in human fecal specimens by flow cytometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2375- 2379, 2005.

DUA, H. S.; ARALIKATTI, A.; SAID, D. G. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 93, p. 1555-1556, 2009.

DUARTE, J. L.; FURST, C.; KLISIEWICZ D. R.; KLASSEN, G.; COSTA, A. O. Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 9–14, 2013.

EISEN, J. A.; COYNE, R. S.; WU, M.; WU, D.; THIAGARAJAN, M.; ET AL. Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. **PLOS Biology**, v. 4(9), 2006.

EPSTEIN, R. J.; WILSON, L. A.; VISVESVARA, G. S.; PLOURDE, E. G. Jr. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis from corneal scrapings using indirect fluorescent antibody staining. **Archives of Ophthalmology**, v. 104 (9), p. 1318-1321, 1986.

FERHAT, M.; ATLAN, D.; VIANNEY, A.; LAZZARONI, J.C.; DOUBLET, P.; GILBERT, C. The TolC protein of *Legionella pneumophila* plays a major role in multi-drug resistance and the early steps of host invasion. **PLoS One**, v. 4(11), p. 7732, 2009.

FERREIRA, V. P.; PANGBURN, M. K.; CORTÉSA, C. Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. **Molecular Immunology**, v. 47(13), p. 2187–2197, 2010.

FIELDS, C.; O'CONNELL, D.; XIAO, S.; LEE, G.; BILLIALD, P.; MUZARD, J. Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. **Nature Protocols**, v. 8, n. 6, p. 1125-1144, 2013.

FLORES, B. M.; GARCIA, C. A.; STAMM, W. E.; TORIAN, B. E. Differentiation of *Naegleria fowleri* from *Acanthamoeba* species by using monoclonal antibodies and flow cytometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28(9), p.1999–2005, 1990.

FREDERICK L. SCHUSTER, GOVINDA S. VISVESVARA. Free-living as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1001-1027, 2004.

FUJISAWA, M.; ITO, M.; KRULWICH, T. A. Three two-component transporters with channel-like properties have monovalent cation/proton antiport activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104 (33), p. 13289-13294, 2007.

GARATE, M.; MARCHANT, J.; CUBILLOS, I.; CAO, Z.; KHAN, N. A.; PANJWANI, N. In vitro pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, p. 1056-1062, 2006.

GHASEMI, H.; GHAZANFARI, T.; YARAE, R.; FAGHIHZADES, S.; HASSAN, Z. M. Roles of IL-8 in ocular inflammations: a review. **Ocular Immunology and Inflammation**, v.19, p. 401-412, 2011.

GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 413-433, 2004.

GUTIERREZ-KOBEH, L.; CABRERA, N.; PEREZ-MONTFORT, R. A mechanism of acquired resistance to complement-mediated lysis by *Entamoeba histolytica*. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 234–241, 1997.

HEALY, J.; EKKERMAN, S.; PLIOTAS, C.; RICHARD, M.; BARTLETT, W.; GRAYER, S. C.; MORRIS, G. M.; MILLER, S.; BOOTH, I. R. Understanding the structural requirements for activators of the Kef bacterial potassium efflux system. **Biochemistry**, v. 53 (12), p. 1982–1992, 2014.

HORI, J. I.; PEREIRA, M. S.; ROY, C. R.; NAGAI, H.; ZAMBONI, D. S. Identification and functional characterization of K⁺ transporters encoded by *Legionella pneumophila* kup genes. **Cellular Microbiology**, v. 15 (12), p. 2006-2019, 2013.

HURT, M.; PROY, V.; NIEDERKORN, J. Y.; ALIZADEH, H. The interaction of *Acanthamoeba castellanii* cysts with macrophages and neutrophils. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 1565-1572, 2003.

IMAYASU, M.; TCHEDRE, K. T.; CAVANAGH, H. D. Effects of multipurpose solutions on the viability and encystment of *Acanthamoeba* determined by flow cytometry. **Eye & Contact Lens**, v. 39(3), p. 228-33, 2013.

IOVIENO, A.; LEDEE, D. R.; MILLER, D.; ALFONSO, E. C. Detection of bacterial endosymbionts in clinical *Acanthamoeba* isolates. **Ophthalmology**, v. 117, p. 441-443, 2010.

JARMUSZKIEWICZ, W.; SLUSE-GOFFART, C. M.; HRYNIEWIECKA, L.; SLUSE, F. E. Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 23198-23202, 1999.

JARMUSZKIEWICZ, W.; WOYDA-PLOSZCZYCA, A.; ANTOS-KRZEMINSKA, N.; SLUSE, F. E. Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. (6-7), p. 792-799, 2009.

JASIM, H.; KNOX-CARTWRIGHT, N.; COOK, S.; TOLE, D. Increase in *Acanthamoeba* keratitis may be associated with use of multipurpose contact lens solution. **British Medical Journal**, 2012.

JENSON, H. B.; GRANT, G. M.; ENCH, Y.; HEARD, P.; THOMAS, C. A.; HILSENBECK, S. G.; MOYER, M. P. Immunofluorescence microscopy and flow cytometry characterization of chemical induction of latent epstein-barr virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5(1), p. 91-97, 1998.

JÓZSI, M. Factor H family proteins in complement evasion of microorganisms front. **Immunological**, v. 8, p. 571, 2017.

KANG, K. J.; KO, S. Y.; RYU, C. J.; JANG, Y. J. A monoclonal antibody recognizes undifferentiation-specific carbohydrate moieties expressed on cell surface of the human dental pulp cells. **Stem Cell Research**, v. 21, p. 85-93, 2017.

KAO, C. L.; WU, M. C.; CHIU, Y. H.; LIN, J. L.; WU, Y. C.; YUEH, Y. Y.; CHEN, L. K.; SHAIQ, M. F.; KING, C. C. Flow cytometry compared with indirect immunofluorescence for rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3672-3677, 2001.

KARSTEN, E.; WATSON, S. L.; FOSTER, L. J. R. Diversity of microbial species implicated in keratitis: a review. **The Open Ophthalmology Journal**, v. 6, p. 110-124, 2012.

KENNETT, M. J.; HOOK, R. R.; FRANKLIN, C. L.; RILEY L. K. *Acanthamoeba castellanii*: characterization of an adhesin molecule. **Experimental Parasitology**, v. 92, p. 161-169, 1999.

KHAN, N. A.; TAREEN, N. K. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. **Folia Parasitologica**, v. 2, p. 97-104, 2003.

KHAN, N. *Acanthamoeba*: biology and pathogenesis. **Caister Academic Press**, ed. 2, 2015.

KHAN, N. *Acanthamoeba*: biology and pathogenesis. **Caister Academic Press**, Norfolk 383 England. 2009.

KHAN, N. A.; GREENMAN, J.; TOPPING, K. P.; HOUGH, V. C.; TEMPLE, G. S.; PAGET, T. A. Isolation of *Acanthamoeba*-specific antibodies from a bacteriophage display library. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38(6), p. 2374-7, 2000.

KHAN, N. A. Pathogenicity, morphology and differentiation of *Acanthamoeba*. **Current Microbiology**, v. 43, p. 391-395, 2001.

KONG, H. H.; KIM, T. H.; CHUNG D. I. Purification and characterization of a secretory serine proteinase of *Acanthamoeba healyi* isolated from GAE. **Journal of Parasitology**, v. 86, p.12-17, 2000.

KUGELBERG, E.; GOLLAN, B.; TANG, C. M. Mechanisms in *Neisseria meningitidis* for resistance against complement-mediated killing. **Vaccine**, v. 26(6), p. 134-139, 2008.

LAVENDER, H.; PONCIN, K.; TANG, C. M. *Neisseria cinerea* expresses a functional factor H binding protein which is recognised by 2 immune responses elicited by meningococcal vaccines. **Infection and Immunity**, p. 1-32, 2017.

LEHER, H.; ZARAGOZA, F.; TAHERZADEH, S.; ALIZADEH, H.; NIEDERKORN, J. Y. Monoclonal IgA antibodies protect against *Acanthamoeba* keratitis. **Experimental Eye Research**, v. 69(1), p. 75-84, 1999.

LIU, K.; LIU, H.; ZHANG, Z.; YE, W.; XU, X. The role of N-glycosylation in high glucose-induced upregulation of intercellular adhesion molecule-1 on bovine retinal endothelial cells. **Acta Ophthalmol**, v. 94(4), p. 353-7, 2016.

LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, p. 1-20, 2015.

MACIVER, S. K.; ASIF, M.; SIMMEN, M. W.; LORENZO-MORALES, J. A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. **European Journal of Protistology**, v. 49, p. 217-221, 2013.

MAGLIANO, A. C.; TEIXEIRA, M. M.; ALFIERI, S. C. Revisiting the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and

- T17): characterization of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic inferences. **Parasitology**, v. 139(1), p. 45-52, 2012.
- MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, p. 273-307, 2003.
- MARCIANO-CABRAL, F.; TONEY, D. M. The interaction of *Acanthamoeba* spp. with activated macrophages and with macrophage cell lines. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, p. 452-8, 1998.
- MARJANOVIC, I.; KANDUS, M.; MIKLAVC, D.; MANC, M.; KEBER, E.; PAVLIN, M. Comparison of flow cytometry, fluorescence microscopy and spectrofluorometry for analysis of gene electrotransfer efficiency. **The Journal of Membrane Biology**, v. 247, p. 1259-1267, 2014.
- MATTANA, A.; SANNA, M.; CANO, A.; DELOGU, G.; ERRE, G.; ROBERTS, C. W.; HENRIQUEZ, F. L.; FIORI, P. L.; CAPPUCCINELLI, P. *Acanthamoeba castellanii* genotype T4 stimulates the production of interleukin-10 as well as proinflammatory cytokines in THP-1 cells, human peripheral blood mononuclear cells, and human monocyte-derived macrophages. **Infection and Immunity**, v. 84, p. 2953-2962, 2016.
- MAYCOCK, N. J.; JAYASWAL, R. Update on *Acanthamoeba* keratitis: Diagnosis, treatment, and outcomes. **Cornea**, v. 35(5), p. 713-720, 2016.
- MOHAN, A.; PADIADPU, J.; BALONI, P.; CHANDRA, N. Complete Genome Sequences of a *Mycobacterium smegmatis* Laboratory Strain (MC² 155) and Isoniazid-Resistant (4XR1/R2) Mutant Strains. **Genome Announcements**, v. 3(1), 2015.
- MONDINO, B. J.; RATAJCZAK, H. V.; GOLDBERG, D. B.; SCHANZLIN, D. J.; BROWN, S. I. Alternate and classical pathway components of complement in the normal cornea. **Archives of Ophthalmology**, v. 98, p. 346-9, 1980.
- MOSS, D. M.; ARROWOOD, M. J. Quantification of *Cryptosporidium parvum* oocysts in mouse fecal specimens using immunomagnetic particles and two-color flow cytometry. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 406-412, 2001.
- NIEDERKORN, J. Y.; ALIZADEH, H.; LEHER, H.; CULLEY, J. P. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 437-443, 1999.
- NIEDERKORN, J. Y. The role of the innate and adaptive immune responses in *Acanthamoeba* keratitis. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 50, p. 53-59, 2002.
- OTRI, A. M.; FARES, U.; AL-AQABA, M. A.; MIRI, A.; FARAJ, L. A.; SAID, D. G.; MAHARAJAN, S.; DUA, H. S. Profile of sight-threatening infectious keratitis: a prospective study. **Acta Ophthalmologica**, v. 91, 643-651, 2013.

PAGE, F. C. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. **Journal of Protozoology Research**, v. 14, p. 709-724, 1967.

PAN, H.; WU, X. Hypoxia attenuates inflammatory mediators production induced by *Acanthamoeba* via Toll-like receptor 4 signaling in human corneal epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 420 (3), p. 685-691, 2012.

POSSAMAI, C.O. **Classificação morfológica, genotipagem e avaliação da patogenicidade de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* em Vitória e região metropolitana (ES)**. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) Programa de pós-graduação em doenças infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.

POWER, M. L.; SHANKER, S. R.; SANGSTER, N. C.; VEAL, D. A. Evaluation of a combined immunomagnetic separation/flow cytometry technique for epidemiological investigations of *Cryptosporidium* in domestic and Australian native animals. **Veterinary Parasitology**, v. 112, p. 21-31, 2003.

PUMIDONMING, W.; WALOCKNIK, J.; DAUBER, E.; PETRY, F. Binding to complement factors and activation of the alternative pathway by *Acanthamoeba*. **Immunobiology**, v. 216, p. 225-233, 2011.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**, v. 13, p. 557-610, 1977.

RAMIREZ, M. I.; RUIZ, R. DE C.; ARAYA, J. E.; DA SILVEIRA, J. F.; YOSHIDA, N. American society for microbiology involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infection and immunity**, v. 62, p. 3636-3641, 1993.

RADFORD, C. F.; MINASSIAN, D. C.; DART, J. K. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. **British Journal of Ophthalmology**, v. 86, p. 536-542, 2002.

REN, M.; GAO, L.; WU, X. TLR4: the receptor bridging *Acanthamoeba* challenge and intracellular inflammatory responses in human corneal cell lines. **Immunology & Cell Biology**, v. 88, p. 529-536, 2010.

REN, M. Y.; WU, X. Y. Toll-like receptor 4 signalling pathway activation in a rat model of *Acanthamoeba* keratitis. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 25-33, 2011.

RÉVEILLER, F. L.; MARCIANO-CABRAL, F.; PERNIN, P.; CABANES, P. A.; LEGASTELOIS, S. Species specificity of a monoclonal antibody produced to *Naegleria fowleri* and partial characterization of its antigenic determinant. **Parasitology Research**, v. 86(8), p. 634-641, 2000.

RITCHIE, G. E.; MOFFATT, B. E.; SIM, R. B.; MORGAN, B. P.; DWEK, R. A.; RUDD, P. M. Glycosylation and the complement system. **Chemical Reviews**, v.102, p. 305-320, 2002.

RIZZO, J.; ALBUQUERQUE, P. C.; WOLF, J. M.; NASCIMENTO, R.; PEREIRA, M. D.; NOSANCHUK, J. D.; RODRIGUES, M. L. Analysis of multiple components involved in the interaction between *Cryptococcus neoformans* and *Acanthamoeba castellanii*. **Fungal Biology**, v. 121 (6-7), p. 602-614, 2017.

ROBAEI, D.; CARNT, N.; MINASSIAN, D. C.; JOHN, K. G.; DART, M. D. Therapeutic and optical keratoplasty in the management of *Acanthamoeba* keratitis: risk factors, outcomes, and summary of the literature. **Ophthalmology**, v. 122, p. 17-24, 2015.

ROCHA-AZEVEDO, B.; COSTA E SILVA-FILHO, F. Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga*: analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. **Archives of Microbiology**, v. 188, p. 441-449, 2007.

ROOSILD, T. P.; CASTRONOVO, S.; HEALY, J.; MILLER, S.; PLIOTAS, C.; RASMUSSEN, T.; BARTLETT, W.; CONWAY, S. J.; BOOTH, I. R. Mechanism of ligand-gated potassium efflux in bacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107 (46), p. 19784-19789, 2010.

ROWBOTHAM, T. J. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. **Journal of Clinical Pathology**, v. 33, p. 1179-1183, 1980.

SAID, N. A.; SHOEIR, A. T.; PANJWANI, N.; GARATE, M.; CAO, Z. Local and systemic humoral immune response during acute and chronic *Acanthamoeba* keratitis in rabbits. **Current Eye Research**, v. 29(6), p. 429-439, 2004.

SCHEID, P.; SCHWARZENBERGER, R. *Acanthamoeba* spp. as vehicle and reservoir of adenoviruses. **Parasitology Research**, v. 1, p. 479-485, 2012.

SCHNEIDER, M. C.; EXLEY, R. M.; CHAN, H.; FEAVERS, I.; KANG, Y. H.; SIM, R. B.; TANG, C. M. Functional significance of factor H binding to *Neisseria meningitidis*. **The Journal of Immunology**, 2006.

SHARMA, S.; GARG, P.; RAO, G. N. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 84, p. 1103-1108, 2000.

SHIN, S. H.; KIM, S.; KIM, J. Y.; SONG, A. H. Y.; CHO, S. C.; KIM, D. R.; LEE, B. K.; LIM, B. H. K.; PARK, B. N. J.; HWANG, I. T.; YANG, K. S. Genome sequence of *Paenibacillus terrae* HPL-003, a xylanase-producing bacterium isolated from soil found in forest residue. **Journal of Bacteriology**, v. 194(5), p. 1266, 2012.

- SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 6, 2012.
- SRINIVASAN, M.; BURMAN, S.; GEORGE, C.; NIRMALAN, P. K. Non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis at a tertiary eye care center in south India: Implications for eye care programs in the region. **Medical Science Monitor**, v. 9(4), p. 125-129, 2003.
- STAPLERON, F.; OZKAN, J.; JALBERT, I.; HOLDEN, B. A.; PETSOGLOU, C.; MCCLELLAN, K. Contact Lens-Related *Acanthamoeba* Keratitis. **Optometry and Vision Science Journal**, v. 86, p. 1196-1201, 2009.
- STOTHARD, D. R.; SCHROEDER-DIEDRICH, J. M.; AWWAD, M. H.; GAST, R. J.; LEDEE, D. R.; RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S.; DEAN, C, L.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45(1), p. 45-54, 1998.
- STRARFORD, M. P.; GRIFFITHS, A. J. Variations in the properties and morphology of cyst of *Acanthamoeba castellanii*. **Journal of General Microbiology**, v. 108, p. 33-37, 1978.
- THOMPSON, P. P.; KOWALSKI, R. P.; HANKS, R. M. Q.; GORDON, Y. J. Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3232-3236, 2008.
- TORDELLO, E. D.; VACCA, I.; RAM, S.; RAPPUOLI, R.; SERRUTO, D. *Neisseria meningitidis* NaIP cleaves human complement C3, facilitating degradation of C3b and survival in human serum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111 (1), p. 427-432, 2014.
- TRABELSI, H.; DENDANA, F.; SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; CHEIKHROUHOU, F.; NEJI, S.; MAKNI, F.; AYADI, A. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. **Pathologie Biologie**, v. 60(6), p. 399-405, 2012.
- TU, E. Y.; JOSLIN, C. E. Recent outbreaks of atypical contact lens-related keratitis: what have we learned? **American Journal of Ophthalmology**, p. 602-608, 2010.
- TURNER, M. L.; COCKERELL, E. J; BRERETON, H. M.; BADENOCH, P. R.; TEA, M.; COSTER, D. J.; WILLIAMS, K. A. Antigens of selected *Acanthamoeba* species detected with monoclonal antibodies. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 981-990, 2005.
- UEHLINGER, F. D.; BARKEMA, H. B.; O'HANDLEY, R. M.; PARENTEAU, M.; PARRINGTON, L. J.; VAN LEEUWEN, J. A.; DIXON, B. R. Comparison of flow cytometry and immunofluorescence microscopy for the detection of *Giardia*

- duodenalis* in bovine fecal samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 178–185, 2008.
- VALDEZ, L. M.; DANG H, O. P. C.; CHAPPELL, C. L. Flow cytometric detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2013-2017, 1997.
- VAN KLINK, F.; TAYLOR, W. M.; ALIZADEH, H.; JAGER, M. J.; VAN ROOIJEN, N.; NIEDERKORN, J. Y. The role of macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 37(7), p. 1271-1281, 1996.
- VILLEMEZ, C. L.; CARLO, P. L.; RUSSELL, M. A. A diferenciação em *Acanthamoeba castellanii* é induzida por anticorpos monoclonais específicos. **J Biochem celular**, v. 29, p. 373-379, 1985.
- VERANI, M.; DI GIUSEPPE, G.; TAMMARO, C.; CARDUCCI, A. Investigating the role of *Acanthamoeba polyphaga* in protecting human adenovirus from water disinfection treatment. **European Journal of Protistology**, v. 54, p. 11-8, 2016.
- VISVESVARA, G. S. Classification of *Acanthamoeba*. **Reviews of Infectious Diseases.**, v. 5, p. 369-372, 1991.
- VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 50, p. 1-26, 2007.
- WALOCHNIK, J.; HALLER-SCHOBER, E.; KOLLI, H.; PICHER, O.; OBWALLER, A.; ASPOCK, H. Discrimination between clinically relevant and non relevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens-wearing keratitis patients in Austria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3932-3936, 2000 a.
- WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPOCK, H. Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4408-4413, 2000 b.
- WALOCHNIK, J.; SOMMER, K.; OBWALLER, A. E.; SCHOBER M. H.; ASPOCK, H. Characterisation and differentiation of pathogenic and non pathogenic *Acanthamoeba* strains by their protein and antigen profiles. **Parasitology Research**, v. 92, p. 289-298, 2004.
- WANSOOK, S.; PATA, S.; KASINRERK, W.; KHUNKAEWLA, P. Biochemical and functional analysis of COS3A, a novel CD63-specific monoclonal antibody. **Asian Pacific Journal of Allergy Immunology**, v. 34(4), p. 306-313, 2016.

WASER, M.; HESS-BIENZ, D.; DAVIES, K.; SOLIOZ, M. Cloning and disruption of a putative NaH-antiporter gene of *Enterococcus hirae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267 (8), p. 5396–5400, 1992.

WILLCOX, M. D.; MORRIS, C. A.; THAKUR, A.; SACK, R. A.; WICKSON, J.; BOEY, W. Complement and complement regulatory proteins in human tears. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, p.1-8, 1997.

WOJTKOWIAK-GIERA, A.; DERDA, M.; KOLASA-WOLOSIUK, A.; HADAS, E.; KOSIK-BOGACKA, D.; SOLARCZYK, P.; JAGODZINSKI, P.P.; WANDURSKA-NOWAK, E. Toll-like receptors in the brain of mice following infection with *Acanthamoeba* spp. **Parasitology Research**, v. 115, p. 4335-4344, 2016.

WOJTKOWSKA, M.; JAKALSKI, H.; PIEŃKOWSKA, Jr.; STOBIENIA, Ó.; KARACHITOS, U.; PRZYTYCKA, T.; WEINER, J.; KMITA, H.; MAKALOWSKI, W. Phylogenetic Analysis of Mitochondrial Outer Membrane β -Barrel Channels. **Genome Biology and Evolution**, v. 4 (2), p. 110-25, 2012.

YODER, J. S.; VERANI, J.; HEIDMAN, N.; ALFONSO, E. C.; JONES, D. B.; BRUCKNER, D.; LANGSTON, R.; JENG, B. H.; JOSLIN, C. E.; TU, E.; COLBY, K.; VETTER, E.; RITTERBAND, D.; MATHERS, W.; KOWALSKI, R. P.; ACHARYA, N. R.; LIMAYE, A. P.; LEITER, C.; ROY, S.; ROBERTS, J.; BEACH, M J. *Acanthamoeba* keratitis: the persistence of cases following a multistate outbreak. **Ophthalmic Epidemiology**, v. 19, p. 221-225, 2012.

YOUSUF, F. A.; SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Presence of rotavirus and free-living amoebae in the water supplies of Karachi, Pakistan. **Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 59, p. 1-7, 2017.

YOUSUF, M. A.; MI-ICHI, F.; NAKADA-TSUKUI, K.; NOZAKI, T. Localization and targeting of an unusual pyridine nucleotide transhydrogenase in *Entamoeba histolytica*. **Eukaryotic Cell**, v. 9(6), p. 926-933, 2010.

ZOLA, H.; MOORE, H. A.; HUNTER, I. K.; BRADLEY, J. Analysis of chemical and biochemical properties of membrane molecules in situ by analytical flow cytometry with monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 74, p. 65-77, 1984.