

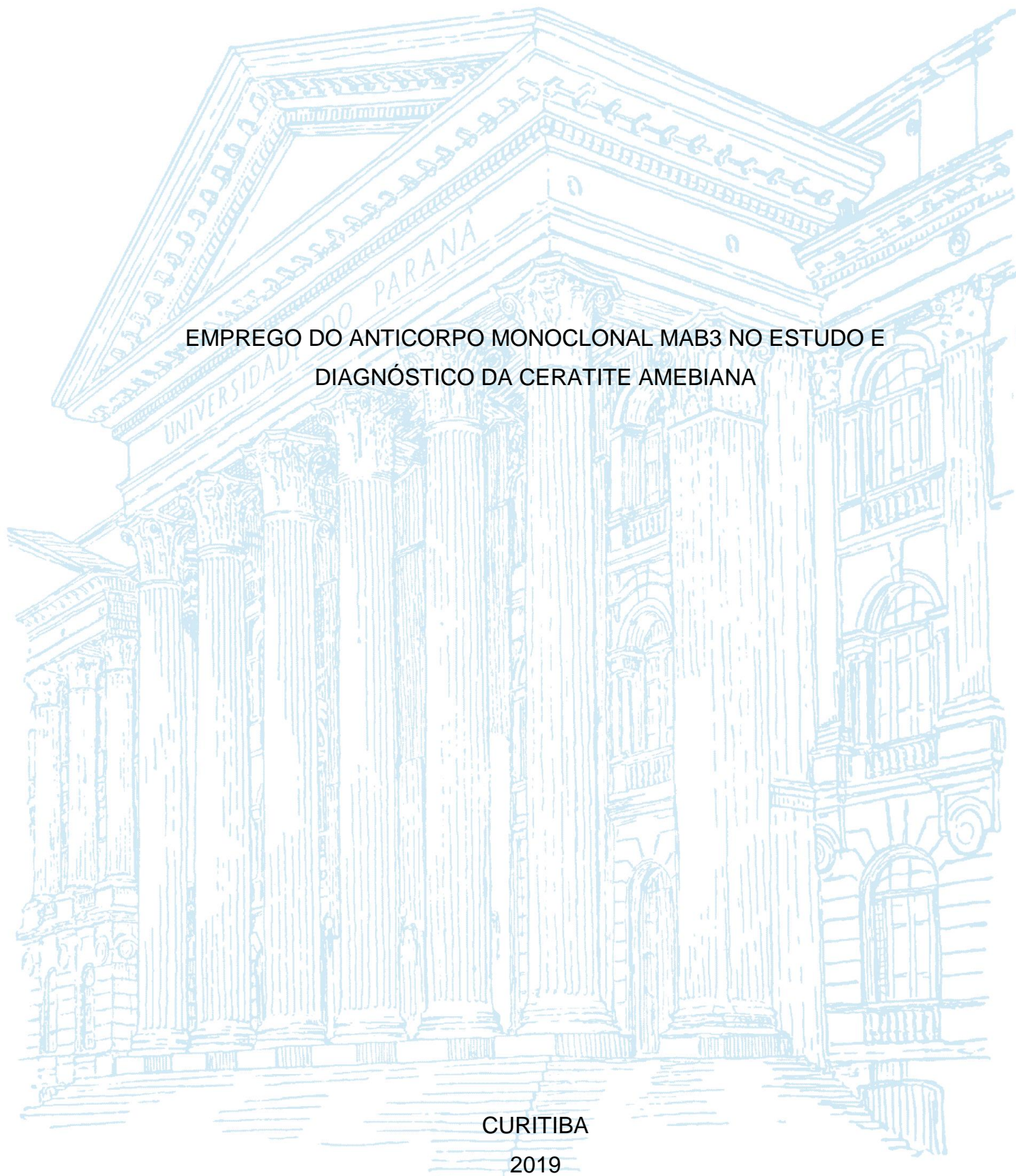
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BIANCA PRADO COSTA

EMPREGO DO ANTICORPO MONOCLONAL MAB3 NO ESTUDO E
DIAGNÓSTICO DA CERATITE AMEBIANA

CURITIBA

2019



BIANCA PRADO COSTA

EMPREGO DO ANTICORPO MONOCLONAL MAB3 NO ESTUDO E
DIAGNÓSTICO DA CERATITE AMEBIANA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao curso de Graduação em biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga

Coorientadora: Profa. Dra. Alessandra Becker Finco

CURITIBA

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

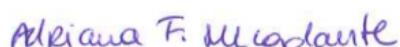
BIANCA PRADO COSTA

EMPREGO DO ANTICORPO MONOCLONAL MAB3 NO ESTUDO E DIAGNÓSTICO DA CERATITE AMEBIANA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.



Prof (a). Dr (a). Larissa Magalhães Alvarenga
Orientador (a) – Departamento de Patologia Básica
Universidade Federal do Paraná



Prof (a). Dr (a). Adriana Frohlich Mercadante
Departamento de Patologia Básica
Universidade Federal do Paraná



Prof (a). Dr (a). Keite da Silva Nogueira
Departamento de Patologia Básica
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 12 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, professoras Larissa e Alessandra, agradeço pela oportunidade, por todo conhecimento que me passaram, pelos conselhos e paciência, eu as admiro muito e sou eternamente grata a vocês.

A todos do Laboratório de Imunoquímica, que já trabalharam comigo e me ajudaram de alguma forma, Prof. Juliana, Bella, Sabrina, Isabel, Chaara, Sarah, Nicolle, Camila, Guillermo, Martina, Bruno, Bruna, Mariana e Fábio, obrigada pelos ensinamentos, cooperação e companheirismo.

À minha família, por todo o apoio, carinho e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus amigos - Ana, Alo, Bel, Bruna, Diego, Lare e Miri – estes anos foram infinitamente melhores por tê-los conhecido e agradeço por tudo que me ensinaram, pelas horas de ócio nos corredores e gramados do poli, pelas risadas, conversas e memórias que estarão sempre comigo.

E a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, obrigada.

“It is important to draw wisdom from different places. If you take it from only one place it becomes rigid and stale.”

– Uncle Iroh

Avatar: The Last Airbender

RESUMO

Amebas de vida livre (AVL) do gênero *Acanthamoeba* são protozoários com ampla distribuição na natureza, podendo ser encontradas em uma enorme variedade de ambientes. As *Acanthamoeba* podem, entretanto, agir como parasitas oportunistas e não-oportunistas, causando doenças graves como, por exemplo, a encefalite amebiana granulomatosa (EAG) e a ceratite amebiana (CA); dentre estas, a segunda tem ganhado mais relevância nos últimos anos devido ao crescente número de casos em consequência do uso de lentes de contato ter se tornado mais comum, sendo o uso indevido destas algo que predispõe a aquisição da doença. A CA é uma infecção grave da córnea, cujo diagnóstico ocorre geralmente através da cultura de raspados corneais, sendo um procedimento, demorado, trabalhoso e de possível erro devido à dificuldade de identificação, além de ser uma patologia de difícil resolução principalmente devido ao tratamento muitas vezes induzir a formação de cistos resistentes. Neste contexto, o emprego de anticorpos monoclonais apresenta-se como uma alternativa para tornar o diagnóstico da CA mais eficaz, além de ser uma ferramenta interessante na busca de novos alvos terapêuticos. Este trabalho tem como objetivos: verificar a possibilidade de aplicação do anticorpo monoclonal mAb3, previamente produzido pelo grupo, no reconhecimento de trofozoítos de *Acanthamoeba* por citometria de fluxo e imunofluorescência; o estudo da interação do anticorpo com o seu alvo através da caracterização imunológica por ELISA, *western blot* e estudos *in silico* de modelagem e *docking*; e a padronização de um ensaio de indução de encistamento em meio Neff para avaliar um possível efeito do mAb3 sobre a cinética de encistamento de *Acanthamoeba*. Observou-se que o mAb3 foi capaz de reconhecer trofozoítos por citometria de fluxo e imunofluorescência, ademais, resultados de ELISA apoiados pelo *docking* sugerem uma alta afinidade na interação do mAb3 com sua proteína alvo. Por fim, foi também possível a padronização de um ensaio de encistamento rápido em 24 horas, e quanto ao efeito do mAb3 sobre o processo de encistamento, foram identificados indícios que o mAb3, por meio de ação citotóxica, possa levar a um aumento na taxa de encistamento, entretanto mais estudos são necessários para confirmação desta hipótese.

Palavras-chave: *Acanthamoeba* 1. Ceratite amebiana 2. Anticorpo monoclonal 3. Encistamento 4. Imunoensaio 5.

ABSTRACT

Free living amoeba of the *Acanthamoeba* genus are organisms with ubiquitous distribution, being commonly found in a great variety of habitats. *Acanthamoeba* can, nevertheless, act as opportunistic and non-opportunistic parasites, causing very serious diseases such as granulomatous amoebic encephalitis (GAE) and amoebic keratitis (AK), the latter has been gaining relevance in recent years due to rising numbers of AK cases as a consequence of contact lenses (CL) use becoming more widespread, considering that bad hygiene habits in CL use are an important factor that facilitates *Acanthamoeba* infection. *Acanthamoeba* keratitis is a corneal infection, usually diagnosed through identification of the pathogen in corneal scrapings of the patient, a slow and laborious process, with low sensitivity. Treatment of AK is also challenging mainly because it often induces the formation of resistant cysts. The use of monoclonal antibodies in this context presents itself as an opportunity for the development of more effective alternative diagnostic methods for AK, as well as an important and useful tool in the search for new therapeutic targets. The aims of the present study were to verify the possibility of using the monoclonal antibody (mAb3), previously produced by our research group, in the detection of *Acanthamoeba* trophozoites through flow cytometry and immunofluorescence; to investigate the interaction between the antibody and its target through immunochemical characterizations using ELISA and western blot and performing *in silico* modelling and docking analyses; and also the padronization of a encystment assay, induced by Neff's medium to assess a potential effect the antibody mAb3 may have on the encystment kinetics. Data obtained show that mAb3 was able to recognize *Acanthamoeba* trophozoites using both flow cytometry and immunofluorescence; ELISA combined with *in silico* docking results suggest a high affinity interaction between mAb3 and its target protein; the development of a fast 24 hours encystment assay protocol was also achieved, and as to the effect of mAb3 on encystment, results were not conclusive, although there were clues that may point to a possible cytotoxic action of mAb3 on trophozoites leading to a higher encystation rate, however, further studies are needed to verify this hypothesis.

Keywords: *Acanthamoeba* 1. Amoebic Keratitis 2. Monoclonal antibody 3. Encystment
4. Immunoassay 5.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MORFOLOGIA DOS TROFOZOÍTOS (A e C) E CISTOS (B) DE <i>Acanthamoeba</i>	17
FIGURA 2. APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA CERATITE AMEBIANA	19
FIGURA 3. PROCESSOS PATOLÓGICOS DA CERATITE AMEBIANA.	20
FIGURA 4. PERFIL ELETROFORÉTICO DO mAb3.....	30
FIGURA 5. REATIVIDADE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO mAb3 FRENTE A ANTÍGENOS BRUTOS DE ISOLADOS DE <i>Acanthamoeba</i> por ELISA indireto.....	31
FIGURA 6. REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE A ANTÍGENOS BRUTOS DE ISOLADOS DE <i>Acanthamoeba</i> POR WESTERN BLOT.....	32
FIGURA 7. DOT PLOT E HISTOGRAMAS REPRESENTANDO O RECONHECIMENTO DE TROFOZOÍTOS DE <i>Acanthamoeba</i> PELO mAb3 POR CITOMETRIA DE FLUXO DIRETA.....	34
FIGURA 8. HISTOGRAMAS <i>OVERLAY</i> REPRESENTATIVOS DO RECONHECIMENTO DE TROFOZOÍTOS DE <i>Acanthamoeba</i> PELO mAb3 POR CITOMETRIA DE FLUXO DIRETA.....	35
FIGURA 9. QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA REPRESENTANDO O RECONHECIMENTO DE TROFOZOÍTOS DE <i>Acanthamoeba</i> PELO mAb3 POR CITOMETRIA DE FLUXO DIRETA.....	36
FIGURA 10. RECONHECIMENTO DE TROFOZOÍTOS DE <i>Acanthamoeba</i> PELO mAb3 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA.....	38
FIGURA 11. QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA REPRESENTANDO O RECONHECIMENTO DE TROFOZOÍTOS DE <i>Acanthamoeba</i> PELO mAb3 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA.....	39
FIGURA 12. DIFERENTES ESTÁGIOS DE ENCISTAMENTO DE <i>Acanthamoeba</i> ..	39
FIGURA 13. PERFIL DO ENCISTAMENTO DE DO ISOLADO AP2 DE <i>Acanthamoeba</i>	40
FIGURA 14. EFEITO DO mAb3 SOBRE A CINÉTICA DO ENCISTAMENTO DE AP2 APÓS 8 HORAS.. ..	42
FIGURA 15. DEBRIS CELULARES OBSERVADOS NOS POÇOS TRATADOS COM mAb3.).	43

FIGURA 16. MODELO MOLECULAR DA DO VH E VL DO MAB3 (VHL_mAb3_opt). ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PORÇÃO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA (VH) E LEVE (VL) DO MAB3.....	44
FIGURA 17. INFORMAÇÕES SOBRE A MODELAGEM DA PROTEÍNA L8H7S3 PELO SERVIDOR PHYRE2.....	46
FIGURA 18. MODELO MOLECULAR DA PROTEÍNA L8H7S3 DA FAMÍLIA CPA2 DE <i>Acanthamoeba</i> (L8H7S3_Phyre2_opt) EM FORMA DIMÉRICA..	47
FIGURA 19. MODELO MOLECULAR DE DOCKING DA PROTEÍNA L8H7S3 COM VH E VL DO MAB3.	48
FIGURA 20. AMINOÁCIDOS NA REGIÃO DE CONTATO ENTRE A L8H7S3 E O VH E VL DO mAb3 NO MODELO DE DOCKING 03.	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE <i>Acanthamoeba</i>	24
TABELA 2. INTERAÇÕES MOLECULARES ENTRE AMINOÁCIDOS NO MODELO DE DOCKING 03.	50

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

Abs	- Absorbância
ATCC	- American Type Culture Collection
AVL	- Amebas de vida livre
CA	- Ceratite Amebiana
CPA2	- Cátion: proton antiporter 2
DAB	- Diaminobenzidina
DMSO	- Dimetilsulfóxido
EAG	- Encefalite Amebiana Granulomatosa
EBI	- <i>European Bioinformatics Institute</i>
ELISA	- <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMBL	- <i>European Molecular Biology Laboratory</i>
FITC	- Isotiocianato de fluoresceína
HRP	- <i>Horseradish peroxidase</i>
IgG	- Imunoglobulina G
IgG-IR	- Imunoglobulina G irrelevante
kDa	- Kilo Daltons
Limq	- Laboratório de Imunoquímica
mAb	- Anticorpo monoclonal
NA	- Não tratado com anticorpo
OPD	- O-Fenilenodiamina
PAGE	- Eletroforese de Gel de Poliacrilamida
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	- <i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PDB	- <i>Protein Data Bank</i>
Prot-IR	- Proteína Irrelevante
PS	- Penicilina/Estreptomicina
PYG	- <i>Peptone/yeast extract/glucose</i> (peptona/estrato de levedura/glucose)
rDNA	- Ácido desoxirribonucleico ribossômico
rRNA	- Ácido ribonucleico ribossômico
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SFB	- Soro fetal bovino

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
UFPR - Universidade Federal do Paraná
VH - Porção variável de cadeia pesada
VL - Porção variável de cadeia leve

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 <i>ACANTHAMOEBA</i> – HISTÓRICO	15
2.2 CICLO DE VIDA E CLASSIFICAÇÃO	16
2.3 <i>ACANTHAMOEBA</i> – PATOLOGIAS	18
2.4 CERATITE POR <i>ACANTHAMOEBA</i> – PATOGÊNESE, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	19
2.5 ANTICORPO MONOCLONAL MAB3.....	22
3 OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 ISOLADOS DE <i>ACANTHAMOEBA</i>	23
4.2 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DO MAB3.....	24
4.3 CONJUGAÇÃO DE ANTICORPOS À FLUORESCÉINA	25
4.4 PRODUÇÃO DE EXTRATOS BRUTIS DE <i>ACANTHAMOEBA</i>	25
4.5 ELISA	25
4.6 ELETROFORESE SDS-PAGE.....	26
4.7 WESTERN BLOT	26
4.8 CITOMETRIA DE FLUXO DIRETA	27
4.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA.....	27
4.10 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE ENCISTAMENTO	27
4.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO MAB3 SOBRE O ENCISTAMENTO	28
4.12 MODELAGEM E <i>DOCKING</i> DO MAB3 COM O TRANSPORTADOR CPA2	28
4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 PURIFICAÇÃO DO MAB3 E REATIVIDADE FRENTE AOS EXTRATOS BRUTOS DE ISOLADOS DE <i>ACANTHAMOEBA</i>	30
5.2 RECONHECIMENTO DOS TROFOZOÍTOS POR CITOMETRIA DE FLUXO....	33
5.3 RECONHECIMENTO DOS TROFOZOÍTOS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA ..	37
5.4 PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE ENCISTAMENTO.....	39
5.5 EFEITO DO MAB3 SOBRE O ENCISTAMENTO DE <i>ACANTHAMOEBA</i>	41

5.6 MODELAGEM E <i>DOCKING</i> DO MAB3 E DA L8H7S3.....	44
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Acanthamoeba spp. é o gênero de amebas de vida livre mais frequente na natureza, podendo ser encontradas em uma grande variedade de habitats, elas possuem duas formas evolutivas em seu ciclo de vida: trofozoítica - fase vegetativa que se alimenta e se reproduz, caracterizada pela presença de projeções na membrana plasmática chamadas acantapódios; e a fase cística - dormente e resistente, que ocorre quando o trofozoíto se encontra em condições ambientais não favoráveis (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; VISVESVARA, 2007).

As *Acanthamoeba*, entretanto, têm a capacidade de sobreviver não apenas no ambiente, mas também de parasitar humanos e outros mamíferos, causando diversas doenças, dentre as quais a ceratite amebiana (CA) tem ganhado grande relevância e interesse clínico recentemente (LORENZO-MORALES et al., 2015; TRABELSI et al., 2012; VISVESVARA, 2007).

A ceratite amebiana (CA) é uma infecção grave da córnea, cuja incidência vem crescendo recentemente devido ao aumento do número de usuários de lentes de contato, considerando que o uso indevido destas, assim como lesão ocular prévia, são os principais fatores de risco para se contrair a doença. Ela acomete majoritariamente indivíduos imunocompetentes e, se não tratada de maneira adequada rapidamente, ela pode facilmente levar a perda de visão, mas se diagnosticada precocemente o prognóstico de CA é promissor (LORENZO-MORALES et al., 2015; TRABELSI et al., 2012; WALOCHNIK et al., 2000).

Os sinais clínicos da CA, entretanto, são regularmente confundidos com outras ceratites causadas por fungos e vírus, dificultando o diagnóstico, cuja confirmação normalmente é feita pela identificação do agente etiológico na cultura do raspado corneal do paciente. Mais recentemente, contudo, têm sido usadas técnicas moleculares para identificação do patógeno devido à maior sensibilidade destas (LORENZO-MORALES et al., 2015; TRABELSI et al., 2012; WALOCHNIK et al., 2000).

Por outro lado, o emprego de anticorpos monoclonais para imunodiagnóstico também se apresenta como uma boa alternativa por ser um método rápido e mais acessível, considerando o quão crucial é que o tratamento adequado seja iniciado o mais cedo possível para se evitar sequelas (SÁNCHEZ et al., 2016; WALOCHNIK et al., 2000). Nota-se também que, atualmente, uma das principais dificuldades em

encontrar terapias eficazes para a CA é devido a fase cística ser resistente à grande parte dos tratamentos utilizados (LORENZO-MORALES et al., 2015; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2019).

Outra vantagem do uso de anticorpos monoclonais é o fato destes permitirem obter informações a respeito do nível de expressão proteica e modificações pós-traducionais, as quais auxiliam na pesquisa e compreensão dos mecanismos patogênicos e imunológicos envolvidos na CA, contribuindo para o estudo do papel de antígenos específicos do patógeno no desenvolvimento da doença, e conseqüentemente, na procura de novos alvos terapêuticos buscando terapias mais eficazes.

Assim, neste projeto, propõe-se empregar o anticorpo monoclonal denominado mAb3, previamente produzido por Becker-Finco et al. (2012) no Laboratório de Imunoquímica da UFPR (Limq), com o objetivo de encontrar alternativas mais rápidas e específicas para o diagnóstico da ceratite amebiana, além de estudar o papel do alvo deste anticorpo no processo de encistamento de *Acanthamoeba*, buscando avaliar a possibilidade de aplicação do mAb3 no contexto de tratamento da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Acanthamoeba* – HISTÓRICO

Amebas do gênero *Acanthamoeba spp.* são protozoários de vida livre comumente encontrados na natureza, e presentes em alta frequência em amostras de solo, água e ar provenientes de diversas origens (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; MERGERYAN, 1991; RIVERA et al., 1989). Dentro deste grupo de amebas de vida livre (AVL) pode-se citar outros representantes como *Balamuthia mandrillaris* e *Naegleria fowleri*; e devido a sua capacidade de sobreviver não apenas no ambiente, mas também como parasitas em hospedeiros mamíferos, estes organismos foram chamados de amebas anfitriônicas (PAGE, 1974; SCHUSTER.; VISVESVARA, 2004).

O potencial patogênico da *Acanthamoeba spp.* foi pela primeira vez demonstrado por Culbertson et al. (1958) em testes para verificação da segurança da vacina contra a poliomielite; após o aparecimento de placas observadas por Jahanes

et al. (1957) em cultura de células de rim de macaco usadas para o preparo das vacinas, as quais inicialmente acreditava-se terem sido causadas por vírus, devido ao fato de que a inoculação do líquido destas culturas em macacos e camundongos levava a morte destes animais por encefalite; posteriormente, entretanto o agente patogênico foi identificado e classificado como *Acanthamoeba spp.* (CULBERTSON et al., 1959; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

Em humanos, os primeiros relatos nos quais a *Acanthamoeba* foi definitivamente reconhecida como agente patogênico ocorreram na década de 1970, os quais incluíam casos de ceratite amebiana (CA), encefalite amebiana granulomatosa (EAG), e infecções de pele (JAGER; STAMM, 1972; NAGINGTON et al., 1974; JONES et al., 1975; GULLETT et al., 1979).

2.2 CICLO DE VIDA E CLASSIFICAÇÃO

O gênero *Acanthamoeba* foi pela primeira vez estabelecido por Volkonsky (1931), cuja primeira espécie a ser descrita foi chamada *Acanthamoeba castellanii*, isolada por Castellani em 1930 como um contaminante de uma cultura de levedura (VISVESVARA et al., 2007). Em seu ciclo de vida, a *Acanthamoeba* pode ser encontrada em dois estados: trofozoíto e cisto. A primeira é a forma vegetativa que se alimenta e se reproduz por fissão binária, enquanto a segunda é a forma dormente e resistente (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003) (FIGURA 1).

Os trofozoítos de *Acanthamoeba* oscilam entre 15 a 50 µm de tamanho dependendo da espécie, são normalmente uninucleados, seu citoplasma tem aspecto granular contendo diversos vacúolos, e, além disso, os trofozoítos também possuem finas projeções em sua membrana plasmática semelhantes a espinhos chamadas de acantapódios, muito característicos deste gênero (VISVESVARA et al., 2007) (FIGURA 1).

Em condições ambientais desfavoráveis, entretanto, tais como privação de nutrientes ou água, altas variações de temperatura, pH ou osmolaridade, os trofozoítos passam pelo processo de encistamento (CHAGLA; GRIFFITHS, 1974; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). Os cistos têm dimensões que variam entre 10 a 25 µm, possuem parede dupla, composta por um envoltório externo, o ectocisto, rico em proteínas e carboidratos (ANWAR et al., 2018); e um envoltório interno, o endocisto, cuja morfologia pode se apresentar poligonal, estralada, esférica ou oval.

Ambos envoltórios são conectados por poros que permitem que o cisto reverta à forma trofozoítica caso as condições sejam novamente favoráveis (PAGE, 1967; VISVESVARA et al., 2007).

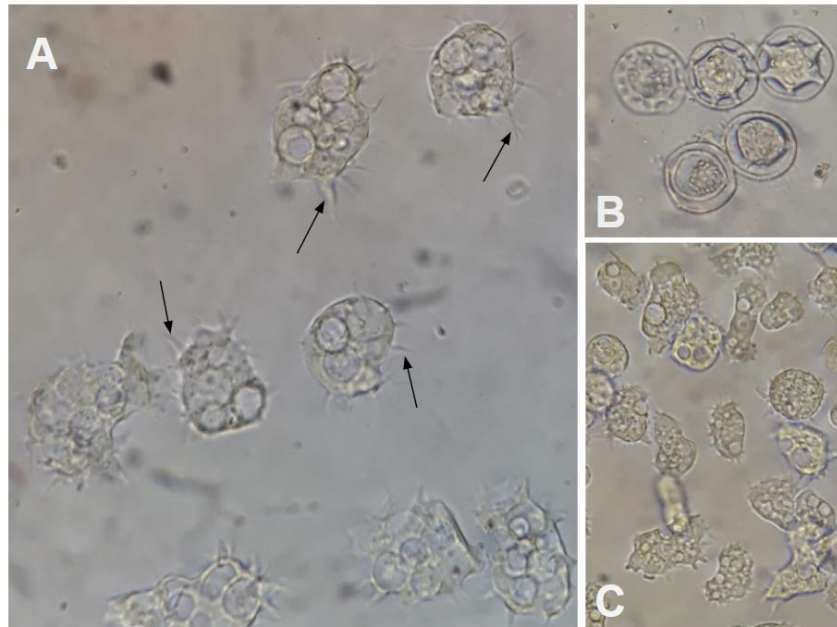


FIGURA 1. MORFOLOGIA DOS TROFOZOÍTOS (A e C) E CISTOS (B) DE *Acanthamoeba*. Imagens obtidas em microscópio invertido. Acantapódios dos trofozoítos indicados pelas setas (A). FONTE: A autora (2019).

Inicialmente, a identificação das espécies de *Acanthamoeba spp.* era feita a partir da morfologia e tamanho dos cistos, com a separação destas em três grupos distintos (I, II e III). No grupo I encontram-se amebas de cistos grandes, com 18 μm ou mais, endocisto estrelado e ectocisto liso ou ondulado; o grupo II consiste em espécies cujos cistos são menores que 18 μm , o endocisto pode ser poligonal, globular, estrelado ou ovóide e ectocisto rugoso; finalmente, as amebas do grupo III possuem cistos com tamanho menor que 19 μm , endocisto globular ou ovóide e ectocisto liso ou rugoso (PUSSARD; PONS, 1977; PAGE, 1967).

Este método de classificação, porém, é questionável devido ao fato de que a morfologia dos cistos pode mudar de acordo com as condições do meio de cultura (STRATFORD; GRIFFITH, 1978). Deste modo, atualmente a abordagem de classificação mais aceita baseia-se em técnicas de biologia molecular pelo sequenciamento de genes, principalmente do rRNA 18S, possibilitando também o estudo da filogenia da *Acanthamoeba spp.* Atualmente, existem 20 genótipos

identificados (T1-T20) (BEHERA, et al., 2016; CORSARO et al., 2015; VISVESVARA et al., 2007; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). O genótipo T4 é o mais frequentemente associado a patologias, sendo ele o mais comumente identificado não apenas nos isolados clínicos, mas também em ambientais (POSSAMAI et al., 2018; DUARTE et al., 2013; MACIVER et al. 2013; VISVESVARA et al., 2007; BOOTON et al., 2005).

2.3 *Acanthamoeba* – PATOLOGIAS

Algumas das principais espécies de *Acanthamoeba* spp. 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* (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; VISVESVARA et al., 2007). Estas podem agir como parasitas oportunistas, causando infecções em indivíduos imunocomprometidos, debilitados ou sofrendo de doenças crônicas, sendo comuns nestas situações casos de encefalite amebiana granulomatosa (EAG), acantamebíase cutânea, e possível comprometimento de diversos outros órgãos e tecidos. Todavia, principalmente como parasitas não-oportunistas, em indivíduos imunocompetentes, dentro dos quais usuários de lentes de contato são particularmente um grupo de risco, as *Acanthamoeba* podem causar ceratite amebiana (CA). Nota-se a EAG e a CA como as duas principais doenças causadas por *Acanthamoeba* nos seres humanos. (VISVESVARA et al., 2007; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

A EAG é uma doença crônica de progressão lenta, cuja infecção pode ser via trato respiratório ou por contato com lesões cutâneas e, por via hematogênica, se dissemina para o Sistema Nervoso Central e outros tecidos (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

A CA é uma infecção da córnea que pode levar a um comprometimento da visão e até cegueira, sua frequência tem aumentado muito nas últimas décadas devido ao crescimento do número de usuários de lentes de contato considerando que o mau uso destas é o principal fator de risco para a aquisição da doença (LORENZO-MORALES et al., 2015; TRABELSI et al., 2012; STAPLETON et al., 2009).

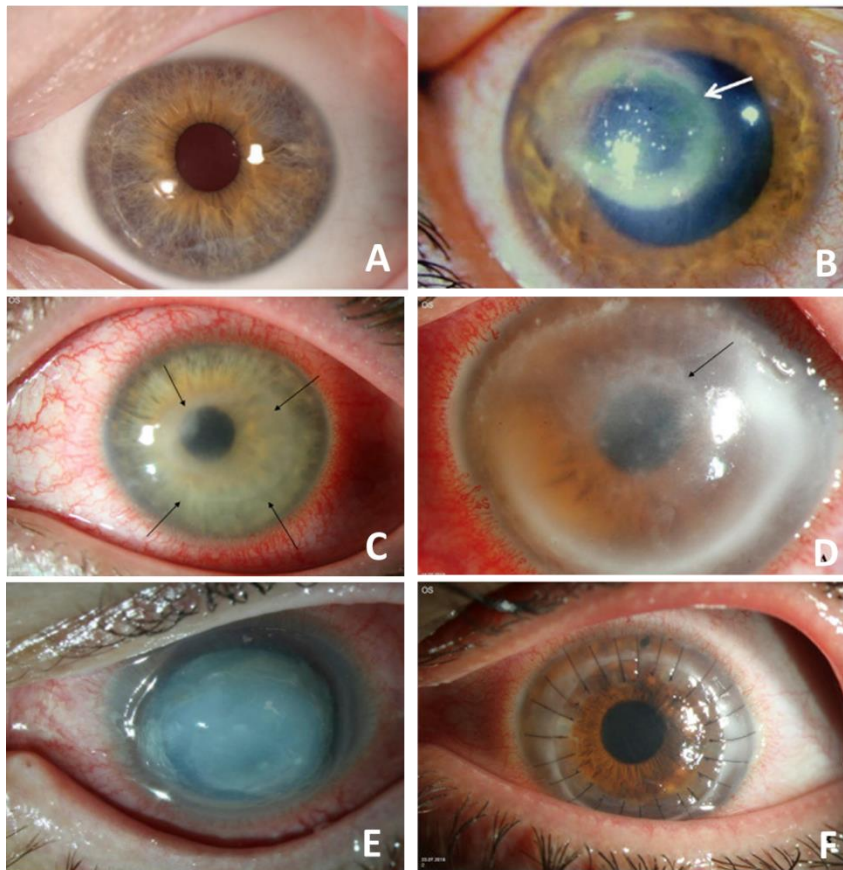


FIGURA 2. APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA CERATITE AMEBIANA. Olho saudável (A). Olho de pacientes com ceratite amebiana apresentando infiltrado estromal em anel (seta) (B, C e D), olho de paciente com ceratite amebiana severa apresentando úlcera corneal grave (E) e olho do paciente da figura D após transplante de córnea para resolução da infecção (F). FONTE: Adaptado de Neelam e Niederkorn (2017) e Szentmáry et al. (2019).

2.4 CERATITE POR *Acanthamoeba* – PATOGÊNESE, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

A ceratite amebiana (CA) é uma doença que se desenvolve principalmente em indivíduos imunocompetentes e, normalmente, em apenas um olho. A ocorrência da infecção depende muito da virulência da *Acanthamoeba* e da integridade da córnea, já que abrasão ocular é pré-requisito para que haja a infecção, especialmente quando a higienização das lentes é feita de modo precário. (TRABELSI, 2012; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004).

Quanto a patogênese da CA, diferentes processos estão envolvidos no mecanismo de infecção por *Acanthamoeba*: inicialmente ocorre a adesão do trofozoíto às células epiteliais da córnea do hospedeiro, processo mediado por adesinas tais como proteína ligadora de manose e proteína ligadora de laminina; em seguida, há a

liberação de uma variedade de enzimas como por exemplo metaloproteases, elastases, fosfolipases e glucosidases, as quais possibilitam a invasão e causam extensa destruição tecidual do epitélio e estroma oculares. (LORENZO-MORALES et al., 2015; TRABELSI et al., 2012; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003) (FIGURA 3).

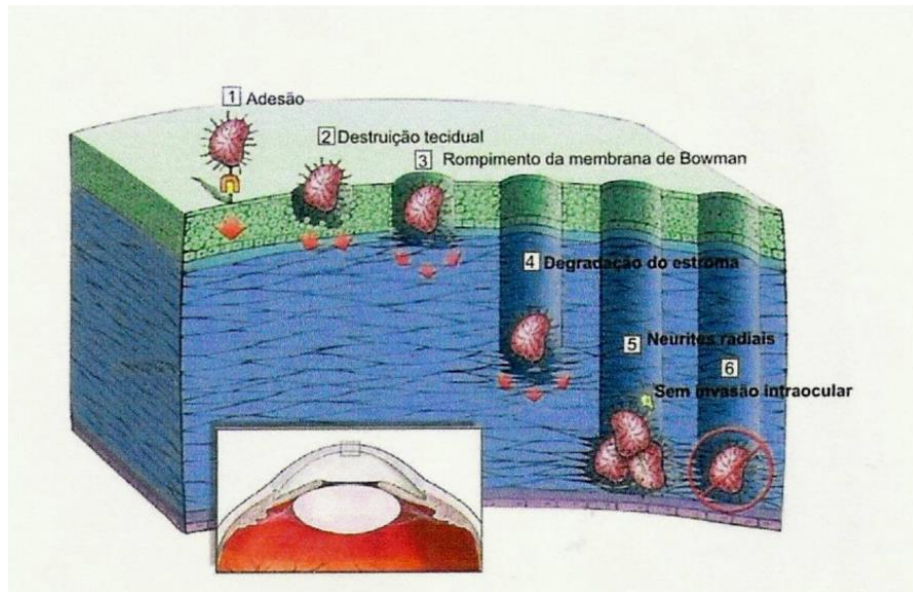


FIGURA 3. PROCESSOS PATOLÓGICOS DA CERATITE AMEBIANA. (1) Adesão do trofozoíto ao epitélio da córnea através de proteínas ligadoras de manose. (2) Trofozoíto começa a produzir enzimas proteases e inicia a invasão do tecido. (3) Rompimento da membrana de Bowman e chegada ao estroma corneal. (4) Trofozoíto continua a secreção de proteases para degradação do estroma. (5) Ataque de nervos córneos, causando dor severa. (6) CA raramente progride para infecção intraocular. FONTE: Adaptado de Clarke e Niederkorn (2006).

Entretanto, muitos mecanismos envolvidos na patogênese da CA ainda não são completamente compreendidos, isso dificulta o desenvolvimento de novas terapias, algo imprescindível considerando que os tratamentos hoje disponíveis não são totalmente eficazes (LORENZO-MORALES et al., 2015).

Uma das principais complicações para o tratamento da CA é a resistência dos cistos à maioria das drogas anti-microbiais, pois, apesar dos trofozoítos apresentarem certa sensibilidade a estas, o patógeno pode entrar na fase dormente, persistir ao tratamento e causar a recidiva da doença uma vez que os níveis da droga se tornam reduzidos (LORENZO-MORALES et al., 2015, SCHUSTER; VISVESVARA, 2004). As drogas mais comumente utilizadas são biguanidas e diaminas, mas também podem ser usados corticóides em alguns casos com inflamação severa (CLARKE et al., 2012).

Quanto ao diagnóstico da CA, este é bastante complicado e frequentemente tardio devido a diversos fatores, dentre estes pode-se citar a demora dos usuários de lentes de contato a procurar ajuda médica por estarem tipicamente acostumados a pequenas irritações oculares. Ademais, a CA é frequentemente confundida com outras ceratites de maior incidência, causadas por vírus e fungos, cujos sintomas clínicos muito se assemelham aos da ceratite por *Acanthamoeba*. (LORENZO-MORALES et al., 2015; TRABELSI et al., 2012). Estas situações muitas vezes permitem que a infecção atinja um estado avançado no qual existe grande comprometimento ocular e, provavelmente, consequências irreversíveis, deixando o paciente com sequelas (TRABELSI et al., 2012).

Assim, um diagnóstico preliminar de CA pode ser feito *in vivo* por microscopia confocal pela observação de cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba*; porém, a confirmação deste diagnóstico deve ser feita pela detecção do agente causador no raspado da córnea do paciente. Esta detecção pode ser realizada por meio de cultura, que é o padrão ouro, ou por técnicas de PCR, as quais começaram a ser aplicadas mais recentemente e que apresentam sensibilidade muito superior ao método de cultura (MAUBON et al., 2019; COSTA et al., 2017; LORENZO-MORALES et al., 2015; TRABELSI et al., 2012). Porém, existem casos nos quais o diagnóstico molecular é falho, como reportado por Scheid e Balczun (2017), nesse sentido os autores concluem que a abordagem mais promissora é a combinação de diferentes técnicas de diagnóstico.

Uma alternativa, neste sentido, é o emprego de anticorpos monoclonais no desenvolvimento de ensaios imunodiagnósticos, um dos benefícios disto, além da rapidez e acessibilidade do método, é a possibilidade de diferenciar se a infecção é causada por cepas mais ou menos patogênicas (SÁNCHEZ et al., 2016; WALOCHNIK et al., 2000). Ademais, nota-se também que a técnica de imunofluorescência e outros métodos imunológicos são bastante empregados no estudo e diagnóstico de parasitoses como por exemplo doença de Chagas (ALVES et al., 2018; GOMES, 2017), malária (GLÓRIA et al., 2018), leishmaniose (MOREIRA et al., 2002; SILVA et al., 2009; BARBOSA et al., 2010), toxoplasmose (BOUER et al., 2010), giardíase (UEHLINGER et al., 2017) e outras parasitoses intestinais (CORRIPIO et al., 2010).

2.5 ANTICORPO MONOCLONAL mAb3

Em relação a este contexto, Becker-Finco et al. produziram, em 2012, um anticorpo monoclonal murino, denominado mAb3, o qual foi capaz de reconhecer sua proteína alvo em dois isolados clínicos de *Acanthamoeba*, em um isolado ambiental com potencial patogênico, mas não no isolado sem patogenicidade. Testes indicaram que esse anticorpo apresentava reatividade com um componente proteico, com aproximadamente 130 kDa, o qual foi hipotetizado ser uma proteína ligadora de manose (MBP) devido à relação entre a reatividade do mAb3 e o potencial patogênico dos isolados - considerando que, segundo Garate et al. (2006) a MBP pode estar relacionada à patogenicidade por atuar na adesão do trofozoíto à córnea do hospedeiro.

Posteriormente, contudo, estudos não publicados conduzidos pelo grupo demonstraram que este não era o caso. Por imunoprecipitação, utilizando-se o mAb3, a proteína alvo de um isolado de *Acanthamoeba* foi purificada e analisada por espectrometria de massa (LIMA et al., 2016). Nesta análise foram identificados peptídeos presentes na sequência da proteína L8H7S3_ACACA (UniProt) - um transportador de íons da família CPA2 (*monovalent cation:proton antiporter-2*). Esta família é pouco estudada em eucariotos (XIANG et al., 2007), entretanto bastante conservada dentro da escala evolutiva, em uma grande variedade de organismos, com importante papel na regulação do pH, volume e concentração de íons celular e função conhecida para osmorregulação e resistência a cátion citotóxicos (FUJISAWA et al, 2007; CHANROJ et al, 2012) .

Desta forma, foram conduzidos experimentos que visaram empregar o mAb3 no desenvolvimento de técnicas para alternativas de diagnóstico mais eficazes e acessíveis para a doença, além de estudar a proteína alvo do mAb3 no contexto do encistamento.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o potencial do anticorpo monoclonal mAb3 para o diagnóstico da ceratite amebiana, além de empregá-lo no estudo da patogênese da doença.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização do perfil de reconhecimento antígenos brutos de *Acanthamoeba* pelo mAb3 por ELISA e *western blot*;
- Verificar a aplicabilidade da técnica de imunofluorescência para identificação de trofozoítos de *Acanthamoeba* utilizando o mAb3;
- Desenvolver um protocolo de citometria de fluxo, utilizando o mAb3, para detecção de diferentes isolados de *Acanthamoeba*;
- Avaliar o efeito induzido pelo mAb3 sobre o processo de encistamento de *Acanthamoeba*;
- Realizar análises *in silico* de *docking* entre o mAb3 e sua suposta proteína alvo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLADOS DE *Acanthamoeba*

As amostras de *Acanthamoeba spp.* foram mantidas em cultivo axênico, em meio PYG (peptona, extrato de levedura, glicose) suplementado com 1% de penicilina e estreptomicina (PS – Gibco 15140-122) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (ROWBOTHAM, 1980). Todos os isolados utilizados neste estudo encontram-se descritos na TABELA 1.

Foi incluída uma cultura de referência do *American Type Culture Collection* (*Acanthamoeba polyphaga*), aqui denominada AP2 (ATCC # 30461, um isolado clínico de lesão de CA) (TABELA 1).

Foram também utilizados: os isolados LG e ALX (de casos de CA), e AR14 e AR15 (de poeira de ambiente doméstico), cedidos pela Prof^a. Dr^a. Cinthia Furst Leroy Gomes da Universidade Federal do Espírito Santo (TABELA 1); o isolado R2P5, axenizado em 2014 no Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), também de poeira doméstica (TABELA 1); e, finalmente, o isolado ambiental de solo AC-G1 - sobre o qual anteriormente foram feitas caracterizações permitindo considerá-lo não

patogênico (TABELA 1), isolado em 2016 e cedido pela MSc Cynara Oliveira Possamai do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Espírito Santo.

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

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

*Genotipagem realizada por sequenciamento gênico do 18S-rDNA por Duarte et al. (2013) e Possamai (2012) e **agrupamento morfológico de acordo com Pussard e Pons (1977). FONTE: Adaptado de LIMA (2017).

4.2 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DO mAb3

Para obtenção do mAb3, os hibridomas secretores do anticorpo, previamente produzidos por Becker-Finco et al. (2013) foram descongelados e as células amplificadas, conforme protocolo descrito pela autora; o sobrenadante celular, contendo o mAb3, foi recuperado e testado por ELISA para confirmar presença de anticorpos funcionais.

Em seguida, a purificação do mAb3 foi feita por cromatografia de afinidade, na qual o sobrenadante dos hibridomas foi incubado com resina de Sepharose conjugada à proteína A e G (BECKER-FINCO et al., 2013). A resina foi lavada com PBS até que houvesse a eluição de todas as proteínas não específicas, seguida por adição de glicina pH 2,8 para eluição do mAb3, recuperada em 30 alíquotas de aproximadamente 200 µl, as quais foram testadas por Bradford para verificar a

presença de proteína, e as amostras positivas foram dialisadas contra PBS para retirada da glicina. Finalmente, verificou-se a concentração de anticorpo pela técnica de Bradford presente na solução obtida.

4.3 CONJUGAÇÃO DE ANTICORPOS À FLUORESCEÍNA

Para realização dos protocolos de citometria de fluxo e imunofluorescência diretas, foi feita a conjugação do mAb3 e de IgGs murinas irrelevantes com isotiocianato de fluoresceína (FITC) conforme orientações do fabricante (Sigma-Aldrich). Os anticorpos foram dialisados em tampão carbonato 0,1 M pH 9, e suas concentrações ajustadas para 1 mg/ml, as amostras foram incubadas com FITC diluído em DMSO (1 mg/ml) - 50 µl de solução de FITC para cada 1 ml de solução de anticorpo, adicionada lentamente de 10 em 10 µl - por 8 horas, sob agitação a 4°C, seguido por adição de NH₄Cl (50 mM), e após 2 horas adição de glicerol 5%. O FITC livre foi removido por gel filtração com resina Sephadex G25M.

Por fim, foi feita a leitura da absorbância das amostras em 280 e 495 nm, para verificar a eficiência da reação de conjugação através da razão F/P, e para dosagem dos anticorpos obtidos. Cálculos feitos aplicando as equações: $F/P \text{ molar} = (2,77 \times A_{495}) / [A_{280} - (0,35 \times A_{495})]$ e $[IgG] \text{ (mg/ml)} = [A_{280} - (0,35 \times A_{495})] / 1,4$.

4.4 PRODUÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS DE *Acanthamoeba*

Conforme Lima et al. (2017), para a produção de extratos brutos de *Acanthamoeba*, trofozoítos dos diferentes isolados foram recuperados e lavados 3 vezes com 10 ml de PBS. Foi adicionado inibidor de protease (*Halt Protease Inhibitor Cocktail - Thermo Scientific*) à suspensão de células, a qual foi em seguida submetida à sonicação, feita com 15 pulsos de 1 minuto (40 volts), com intervalo de 30 segundos entre os pulsos. Por fim, as amostras foram centrifugadas para obtenção dos antígenos solúveis.

4.5 ELISA

Antígenos brutos de *Acanthamoeba* (10 µg/ml) foram imobilizados em placas NUNC de 96 poços *overnight* a 4°C. A placa foi, no dia seguinte, incubada com solução

de bloqueio (caseína 2%, PBS) por 1 hora a 37°C, seguida por incubação com solução contendo o mAb3 purificado diluído em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína, 0,05% tween 20) em diferentes concentrações (20, 2, 0,2, 0,02 e 0,002 µg/ml), sob as mesmas condições. Foi então adicionado um anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com a enzima peroxidase (1:5000). Foi também testada a reatividade dos antígenos imobilizados à placa frente a apenas o anticorpo secundário como um controle negativo - a absorbância aqui obtida foi subtraída da absorbância dos demais poços. Entre cada uma das etapas os poços foram lavados três vezes com solução de lavagem (0,05% tween-salina). A reação de revelação foi realizada pela adição de ortofenilenodiamino (OPD) e H₂O₂ em tampão citrato, e interrompida com ácido sulfúrico. As leituras de absorbância foram feitas a 490 nm.

4.6 ELETROFORESE SDS-PAGE

Para avaliação da presença de contaminantes nas alíquotas de mAb3 purificado e para a separação das proteínas dos extratos brutos de *Acanthamoeba*, em condições redutoras ou não, ou seja, com ou sem adição de β-mercaptoetanol, estas amostras foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE conforme metodologia descrita por Laemmli (1970). A migração ocorreu em tampão de corrida (Tris 0,025 mol/L, glicina 0,2 mol/L e SDS 0,5%, pH 8,3) a 150 volts. Os géis foram em seguida corados por prata, *coomassie blue* ou utilizados para realização de *western blot*.

4.7 WESTERN BLOT

As proteínas (5 µg) dos extratos brutos de *Acanthamoeba* foram separadas por eletroforese SDS-Page em gel de poliacrilamida 12% e, em seguida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose a 24 volts *overnight*, e 48 volts por mais uma hora no dia seguinte, em tampão de transferência pH 8,3 (glicina 0,2 mol/L, Tris 0,025 mol/L e metanol 20%). Em seguida a presença das proteínas na membrana foi certificada colocando-a em solução de Ponceau 0,2% e ácido acético 10%, após lavagem com PBS-tween 0,05% (PBS-T 0,05), os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS-tween 0,2%, caseína 5% por 1 hora à 37°C, a membrana foi então incubada com o mAb3 (1,5 µg/ml) diluído em PBS-T 0,05% sob as mesmas

condições, seguida por incubação com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com a enzima peroxidase (1:8000), também sob as mesmas condições. As lavagens após as etapas de incubação foram realizadas com PBS-T 0,05, com uma lavagem adicional apenas com PBS após incubação do anticorpo secundário.

A revelação foi feita por DAB/cloronaftol com solução de PBS contendo 4-cloro-1-naftol 0,025%, metanol 7,6%, diaminobenzidina (DAB) 0,05% e H₂O₂ 0,04%.

4.8 CITOMETRIA DE FLUXO DIRETA

Trofozoítos dos diferentes isolados foram recuperados, fixados com paraformaldeído 2% por 30 minutos (em temperatura ambiente), sítios inespecíficos foram bloqueados com albumina 1% por uma hora (também em temperatura ambiente) e, em seguida, com o anticorpo mAb3 conjugado a FITC (fluoresceína) (20 µg/ml) por 90 minutos - a incubação com o anticorpo ocorreu à 37° C para todos os isolados exceto o AC-G1, o qual foi feito em temperatura ambiente - foram então contados 3 x 10⁴ trofozoítos, os quais foram transferidos para os tubos de citometria.

Como controles negativos foram utilizados os trofozoítos incubados com um anticorpo irrelevante conjugado a FITC e trofozoítos não tratados com nenhum anticorpo para avaliação da autofluorescência.

A fluorescência das amostras foi medida pelo citômetro BD FACS Celesta (filtro B-530-30-A) e os resultados foram analisados pelo *software Flowing* (versão 2.5.1).

4.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

Para avaliar a capacidade do mAb3 de detectar trofozoítos de *Acanthamoeba*, a partir das amostras preparadas para os experimentos de citometria de fluxo pelo protocolo direto, foram confeccionadas lâminas, as quais foram observadas por microscopia de fluorescência (Microscópio Confocal Nikon). As imagens geradas foram analisadas utilizando-se o *software* Fiji e a fluorescência quantificada e normalizada pela área de cada célula.

4.10 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE ENCISTAMENTO

Todos os experimentos descritos a seguir seguem o protocolo de indução de encistamento estabelecido no qual trofozoítos de *Acanthamoeba* foram recuperados, centrifugados e lavados três vezes com salina de Page, após última centrifugação, os trofozoítos foram ressuspensos em meio de encistamento de Neff, contados em câmara de Neubauer e distribuídos em placa de 24 poços ($0,25 \times 10^5$ trofozoítos/poço). Em diferentes tempos após início do ensaio, os poços foram observados em microscópio de luz invertido, sendo feita a análise de no mínimo 3 campos aleatórios ou 200 células (LLOYD, 2014), e foram contadas as *Acanthamoeba* em forma de trofozoíto, cisto imaturo e cisto maduro (KHUNKITTI et al., 1998).

Quanto aos principais critérios para identificação dos estágios, foram considerados trofozoítos as células que apresentavam acantapódios, cistos imaturos as células com formato esférico, de parede lisa e com ausência de parede dupla, e cistos maduros aqueles nos quais era claramente possível identificar a presença de parede cística interna e externa (KHUNKITTI et al., 1998; CHÁVEZ-MUNGUÍA et al. 2013).

4.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO mAb3 SOBRE O ENCISTAMENTO

Após preparo dos trofozoítos e distribuição destes na placa como mencionado anteriormente, os poços foram divididos em três grupos - com trofozoítos tratados com mAb3 (30, 10 e 1 $\mu\text{g/ml}$), tratados com uma proteína irrelevante nas mesmas concentrações e tratados apenas com veículo (PBS). Em seguida os poços foram observados nos tempos 4, 8, 12 e 24 horas, e foi documentada a porcentagem de *Acanthamoeba* nos diferentes estágios de encistamento.

4.12 MODELAGEM E DOCKING DO mAb3 COM O TRANSPORTADOR CPA2

A partir da sequência aminoacídica dos domínios variáveis de cadeia leve (VL) e pesada (VH) do mAb3 (LIMA, 2017), e do transportador CPA2 de *Acanthamoeba* (UniProt L8H7S3_ACACA) - que teve parte de sua sequência identificada na análise de espectrometria de massas da proteína alvo do mAb3 purificada (LIMA, 2017) - foram construídos modelos moleculares, respectivamente, através do software Modeller com interface pelo UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004) e do servidor Phyre2 (*Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0*) (KELLEY et al., 2015).

Em seguida, a qualidade dos modelos foi avaliada pelo servidor MolProbity (ZHAO et al, 2012), utilizando como principal critério os *outliers* do diagrama de Ramachandran. Sua otimização foi realizada pelo Chimera no caso do modelo de VH e VL do mAb3, e parcialmente através do servidor YASARA (KRIEGER et al., 2009) e pelo Chimera para o modelo do transportador CPA2.

Por fim, através do servidor ClusPro, foi realizado o *docking* dos dois modelos previamente obtidos (BRENKE et al., 2012; KOZAKOV et al, 2017). Através de dados experimentais prévios, sabe-se que o mAb3 é capaz de interagir com o seu alvo na superfície dos trofozoítos de *Acanthamoeba* sem a permeabilização destas células, por este motivo, para triagem dos modelos de *docking* gerados, foram considerados apenas aqueles em que o mAb3 interagiu em regiões extracelulares do transportador CPA2 (conforme previstas pelo servidor Phyre2 na produção do modelo).

Em seguida, as análises de interação dos aminoácidos entre o mAb3 e o possível alvo foram realizadas pelo PDBSum do Instituto Europeu de Bioinformática (EMBL-EBI) e outros critérios utilizados para seleção do modelo mais provável foram: presença de asparaginas passíveis de N-glicosilação próximas ao sítio de interação antígeno/anticorpo, cuja predição foi realizada pelo servidor NetNGlyc 1.0; e coerência com os padrões de reconhecimento do mAb3 frente a proteína alvo purificada e de fragmentação de peptídeos na análise de espectrometria de massa (LIMA, 2017).

4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas análises estatísticas foram realizadas pelo *software GraphPad Prism* 8.0.1, aplicando o teste de ANOVA de uma ou duas vias. Valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PURIFICAÇÃO DO mAb3 E REATIVIDADE FRENTE AOS EXTRATOS BRUTOS DE ISOLADOS DE *Acanthamoeba*

O anticorpo monoclonal mAb3 foi purificado por coluna de resina de Sepharose conjugada à proteína A e G a partir do sobrenadante celular de hibridomas secretores do anticorpo. Após o processo de purificação o perfil proteico da amostra obtida foi analisado por eletroforese SDS-PAGE, para confirmação da pureza do anticorpo. Em condições não redutoras é possível a observação de apenas uma banda de aproximadamente 150 kDa correspondente à molécula de IgG inteira, enquanto que em condições redutoras observa-se a presença de 3 bandas, de 25 e 50 kDa, correspondentes, respectivamente às cadeias leve e pesada do mAb3, e outra com 150 kDa referente à fração das moléculas que não sofreram ação redutora. A ausência de outras bandas no perfil proteico das amostras indica eficácia e especificidade do processo de purificação (FIGURA 4).

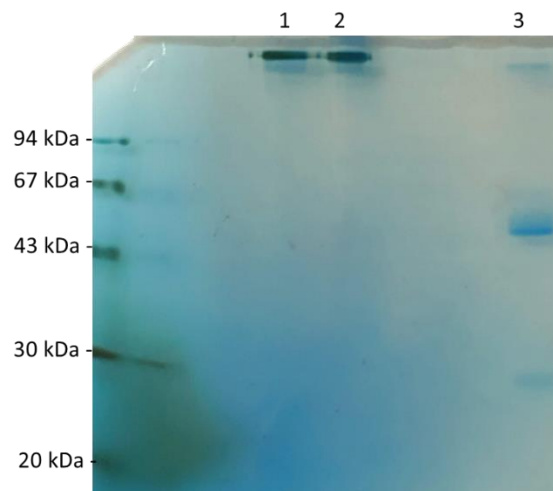


FIGURA 4. PERFIL ELETROFORÉTICO DO mAb3. Gel de eletroforese SDS-PAGE 12,5% corado por prata e coomassie. Amostras do anticorpo mAb3 purificado na ausência (1 e 2) e presença (3) de condições redutoras. FONTE: A autora (2019).

Para caracterização imunológica do mAb3 foi realizado um ensaio de ELISA indireto de titulação do anticorpo, a reatividade de diferentes concentrações do mAb3 (20 - 0,002 $\mu\text{g/ml}$) foi testada frente a uma concentração fixa de extratos brutos de diferentes isolados de *Acanthamoeba* (10 $\mu\text{g/ml}$). Observa-se que o mAb3 foi capaz

de reconhecer os isolados potencialmente patogênicos AP2, ALX, LG, R2P5, AR14 e AR15, mas não o isolado AC-G1. Ademais, nota-se que, apesar do anticorpo ter sido diluído 10.000 vezes, a queda da reatividade entre a maior e menor concentração de mAb3 foi de, aproximadamente, apenas 3 vezes. Essa manutenção de reatividade sugere uma alta afinidade entre o mAb3 e o seu alvo (FIGURA 5).

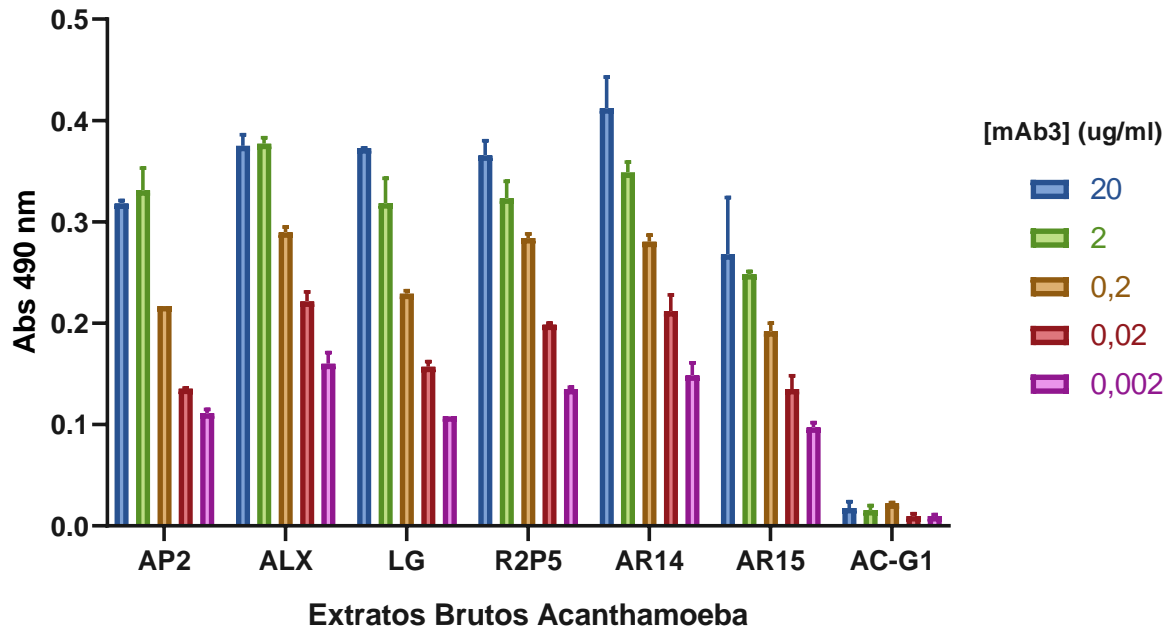


FIGURA 5. REATIVIDADE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO mAb3 FRENTE A ANTÍGENOS BRUTOS DE ISOLADOS DE *Acanthamoeba* por ELISA indireto. Antígenos de extrato bruto de *Acanthamoeba* dos isolados AP2, ALX, LG, R2P5, AR14, AR15 e AC-G1 (10 µg/ml) foram testados frente a diferentes diluições de mAb3 (20 - 0,002 µg/ml). Dados no gráfico correspondem à média ± erro padrão (n=2). FONTE: A autora (2019).

Entretanto, deve-se também ser levada em conta a baixa absorbância obtida, mesmo nos pontos de maior concentração do mAb3 (FIGURA 5), a qual não reproduz experimentos anteriores realizados pelo grupo. Isto talvez seja explicado devido à uma imprecisão na dosagem proteica dos extratos brutos, ou talvez pela fração do extrato correspondente à proteína alvo do mAb3 estar diminuída nesta preparação.

Como sugerimos que o alvo seja um componente de membrana, o método de sonicação, empregado para obtenção dos extratos brutos, pode apresentar um rendimento menor quanto a extração e solubilização da proteína de interesse quando comparado à outras metodologias que fazem uso de tampões de lise com base em detergentes, por exemplo (MANDON et al., 2017; MUINAO et al., 2018). A utilização

de detergentes, no entanto, traz desvantagens como possível comprometimento na estabilidade e estrutura das proteínas, além de interferir na dosagem pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976; KARLOVA et al., 2019).

Foi também verificado o perfil de reconhecimento do mAb3 frente a extratos brutos de *Acanthamoeba* por *western blot* (FIGURA 6), neste experimento foi observada reatividade inespecífica considerável, possivelmente devido à excesso na concentração de anticorpo primário e/ou secundário. Entretanto, devido a experimentos anteriores conduzidos pelo grupo sabe-se que proteína alvo do mAb3 encontra-se na faixa entre 100 e 200 kDa (caixa laranja), onde é possível observar algumas bandas com reatividade mais intensa. Além disso, interessante, observa-se uma semelhança no padrão de reconhecimento dos extratos de isolados clínicos AP2, ALX e LG, que diferiu um pouco do perfil observado nos isolados de poeira doméstica R2P5, AR14 e AR15, nestes últimos, bandas com massa ligeiramente maior, sugerindo que o epítipo do mAb3 está presente em todos os isolados, mas a proteína alvo pode diferir entre eles.

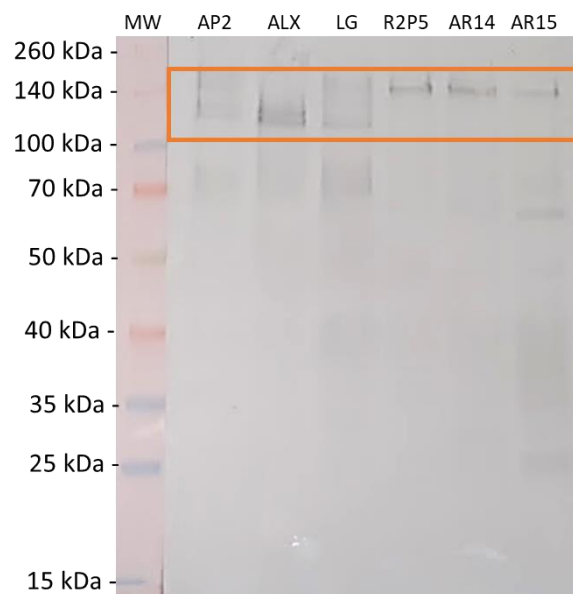


FIGURA 6. REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE A ANTÍGENOS BRUTOS DE ISOLADOS DE *Acanthamoeba* POR *WESTERN BLOT*. Antígenos de extrato bruto de *Acanthamoeba* dos isolados AP2, ALX, LG, R2P5, AR14 e AR15 (5 µg/ml) foram submetidos à separação por eletroforese SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. A reatividade do mAb3 frente a estes antígenos foi testada, e a reação foi revelada por DAB/Cloronaftol. Caixa laranja: faixa onde espera-se encontrar a proteína alvo do mAb3. FONTE: A autora (2019).

Desta forma, tanto para os experimentos de ELISA e *western blot* há necessidade de ajuste da metodologia dos ensaios para otimização dos resultados.

5.2 RECONHECIMENTO DOS TROFOZOÍTOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para verificar a capacidade do mAb3 de reconhecer trofozoítos de *Acanthamoeba* por citometria de fluxo direta, visando avaliar a possibilidade de utilização da técnica no desenvolvimento de um método diagnóstico para ceratite amebiana, trofozoítos de sete isolados de *Acanthamoeba* foram incubados com mAb3 conjugado à FITC e analisados em citômetro de fluxo.

Todas as amostras dos isolados AP2, ALX, LG, R2P5, AR14 e AR15 tratados com mAb3-FITC mostraram fluorescência superior à dos controles negativos não tratados com anticorpo (NA) e tratados com uma IgG irrelevantes conjugada à FITC (IgG IR-FITC), como evidenciado pelo deslocamento dos picos nos histogramas (FIGURAS 7 e 8A-8F), e pela diferença estatisticamente significativa entre a média de fluorescência dos eventos dos grupos tratados com o mAb3-FITC quando comparados aos controles negativos (FIGURA 9A).

O mAb3 foi, entretanto, incapaz de reconhecer o isolado AC-G1 não patogênico - apesar de ser possível observar pequeno deslocamento do pico referente à amostra tratada com mAb3 quando comparada à amostra não tratada com anticorpo (FIGURA 8G e 9C), ainda houve grande sobreposição da fluorescência entre os três grupos.

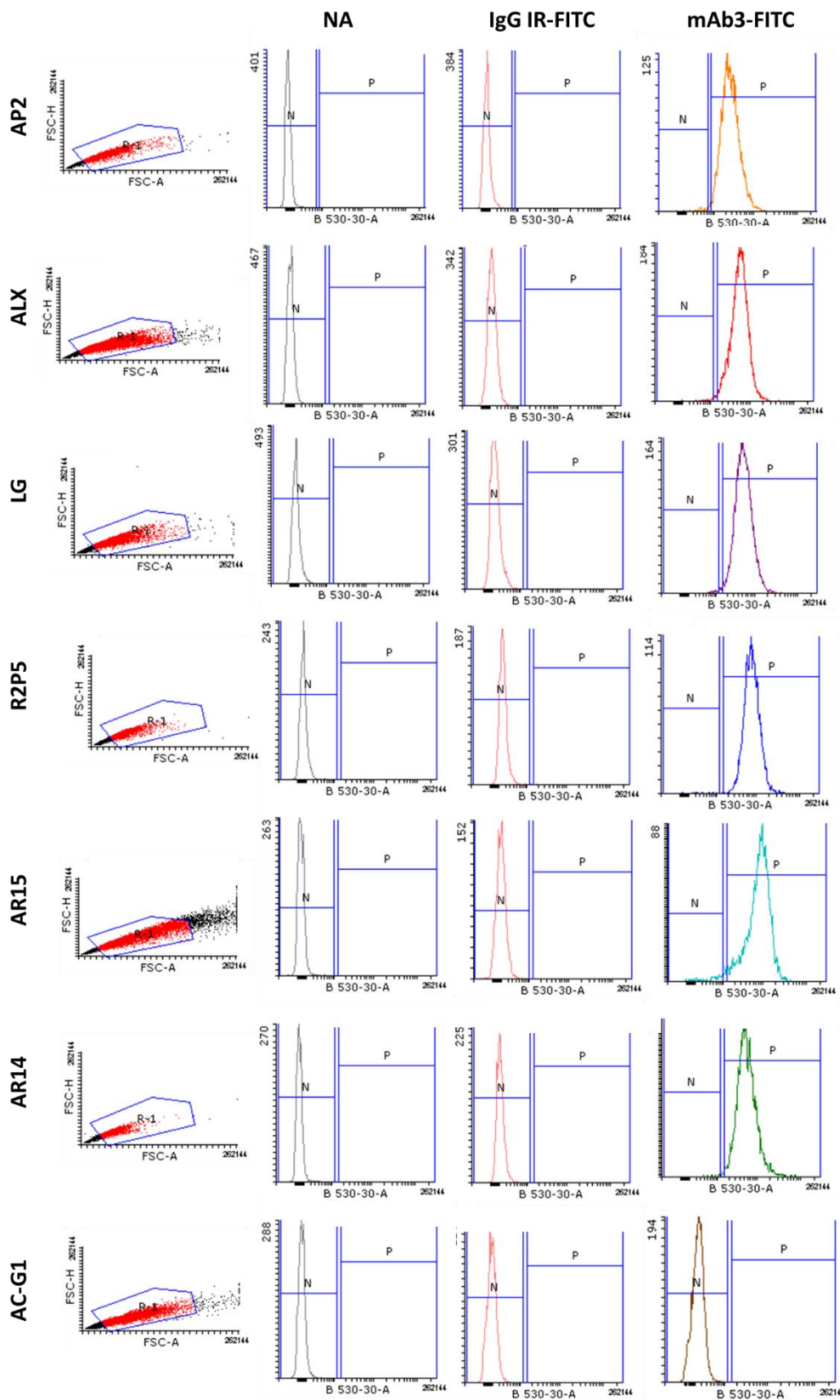


FIGURA 7. DOT PLOT E HISTOGRAMAS REPRESENTANDO O RECONHECIMENTO DE TROFOZOÍTOS DE *Acanthamoeba* PELO mAb3 POR CITOMETRIA DE FLUXO DIRETA. Dot Plot e histogramas das análises de citometria de fluxo dos isolados AP2, ALX, LG, R2P5, AR14, AR15 e AC-G1 não tratados com anticorpo (NA), tratados com IgG irrelevante-FITC (IgG IR-FITC) (20 μ g/ml) e com mAb3-FITC (20 μ g/ml). Demarcação das regiões de eventos negativos (N), e positivos (P) com base na fluorescência das amostras tratadas com IgG irrelevante-FITC. FONTE: A autora (2019).

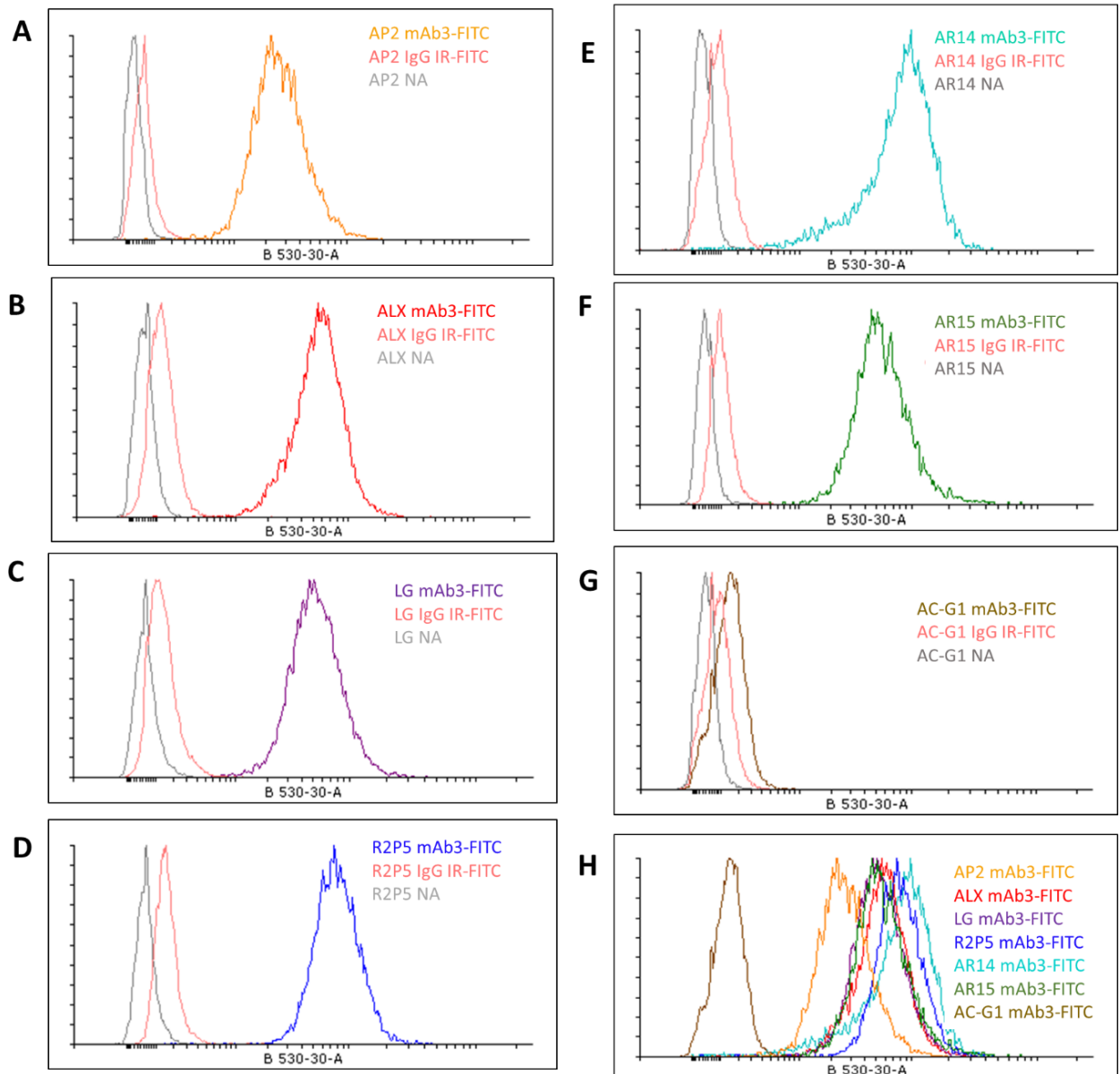


FIGURA 8. HISTOGRAMAS OVERLAY REPRESENTATIVOS DO RECONHECIMENTO DE TROFOZOÍTOS DE *Acanthamoeba* PELO mAb3 POR CITOMETRIA DE FLUXO DIRETA. Histogramas *overlay* das análises de citometria de fluxo dos isolados AP2, ALX, LG, R2P5, AR14, AR15 e AC-G1 não tratados com anticorpo (NA), tratados com IgG irrelevante-FITC (IgG IR-FITC) (20 µg/ml) e tratados com mAb3-FITC (20 µg/ml) (A-G), e histograma *overlay* de amostras tratadas com mAb3-FITC de todos os isolados (H). FONTE: A autora (2019).

Além disso, conforme demarcações das regiões de eventos positivos (P) e negativos (N) mostrados na FIGURA 7, foi também feita a análise da porcentagem de eventos das amostras tratadas com mAb3-FITC os quais tiveram uma fluorescência superior à maior fluorescência detectada nos controles negativos (FIGURA 9B) - os isolados AP2, ALX, LG, R2P5, AR14 e AR15 tratados com mAb3 todos apresentaram

acima de 90% de eventos positivos, enquanto que o isolado AC-G1 teve menos que 0,2%, confirmando a especificidade do mAb3.

Nota-se, entretanto, que o número de trofozoítos utilizados para realização do ensaio (3×10^4) é muito superior ao que se estima ser possível obter em um raspado corneal de um paciente com ceratite amebiana, havendo a necessidade - no caso da possibilidade de aplicação desta técnica como método diagnóstico - do cultivo das *Acanthamoeba* potencialmente recuperadas no raspado, para que um número maior de trofozoítos possa ser analisado e tornar o teste mais confiável.

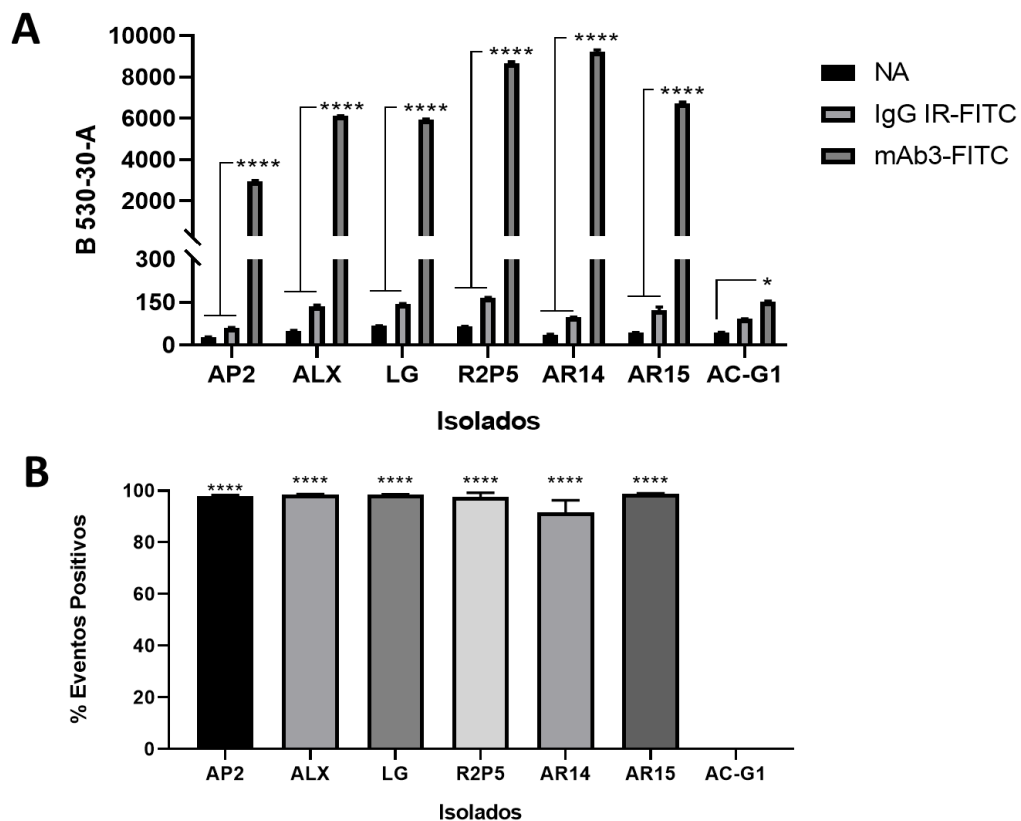


FIGURA 9. QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA REPRESENTANDO O RECONHECIMENTO DE TROFOZOÍTOS DE *Acanthamoeba* PELO mAb3 POR CITOMETRIA DE FLUXO DIRETA. Média de fluorescência dos eventos detectados por citometria de fluxo de amostras não tratadas com anticorpo (NA), tratadas com IgG IR-FITC (IgG irrelevante-FITC) (20 μ g/ml) e com mAb3-FITC (20 μ g/ml) dos isolados AP2, ALX, LG, R2P5, AR14, AR15 e AC-G1 (A). Porcentagem de eventos das amostras dos isolados AP2, ALX, LG, R2P5, AR14, AR15 e AC-G1 tratados com mAb3-FITC (20 μ g/ml) cuja fluorescência apresentou-se superior à dos controles negativos tratados com IgG irrelevante-FITC (20 μ g/ml) (B). Dados apresentados correspondem à média \pm erro padrão, $5453 < n < 10785$ (A), $n=2$ (B). **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$ (A). **** $p < 0,0001$ vs. AC-G1 (B). FONTE: A autora (2019).

Ainda assim, outras tentativas na literatura da utilização de anticorpos para detecção de trofozoítos de *Acanthamoeba* por citometria de fluxo (KHAN et al., 2000; TURNER et al., 2005), foram bem sucedidas, entretanto utilizando amostras com um

número de trofozoítos ainda superior (1×10^6 e 1×10^7), com uma diferença de fluorescência entre os controles negativos e amostras positivas menor do que a obtida neste trabalho. Khan et al. (2000) e Turner et al. (2005), além disso, aplicaram um protocolo de citometria indireta, o qual apresenta a desvantagem de ser mais longo e com maior risco de reatividade inespecífica (interação do anticorpo secundário com as células de interesse) do que o protocolo aqui proposto.

Ademais, o fato dos trofozoítos não terem sido permeabilizados no preparo das amostras e a marcação ter sido eficaz, dão suporte para a hipótese de que a proteína alvo do mAb3 seja uma proteína de membrana, com a região de interação em domínio extracelular (DELMONTE; FLEISHER, 2019).

5.3 RECONHECIMENTO DOS TROFOZOÍTOS POR IMUNOFLOURESCÊNCIA

As mesmas amostras dos isolados AR14, ALX, LG e R2P5 preparadas para citometria de fluxo foram utilizadas para montagem de lâminas, as quais foram observadas em microscopia confocal, sendo possível observar uma marcação positiva dos trofozoítos tratados com mAb3-FITC, com uma fluorescência superior à autofluorescência das células (FIGURA 10).

Os resultados obtidos corroboram com o que foi observado por citometria de fluxo, com os trofozoítos das amostras tratadas com mAb3-FITC apresentando uma média de fluorescência significativamente superior àquela dos controles negativos não tratados com anticorpo (NA) e tratados com uma IgG irrelevante conjugada a FITC (IgG IR-FITC) (FIGURA 11).

Apesar de alguns laboratórios já utilizarem imunofluorescência no auxílio do diagnóstico da CA (LORENZO-MORALES et al. 2015), e de existirem diversos trabalhos que empregaram a técnica para detecção de trofozoítos (EPSTEIN et al., 1986; KHAN et al., 2000; MAGNET et al., 2012; BECKER-FINCO et al., 2013; KANG et al., 2018), vários destes utilizam anticorpos policlonais (cuja produção requer imunização e sangria constante de animais) e todos aplicam o método de detecção indireto, que como já mencionado, aumenta chances de reatividade inespecífica e torna o protocolo mais laborioso.

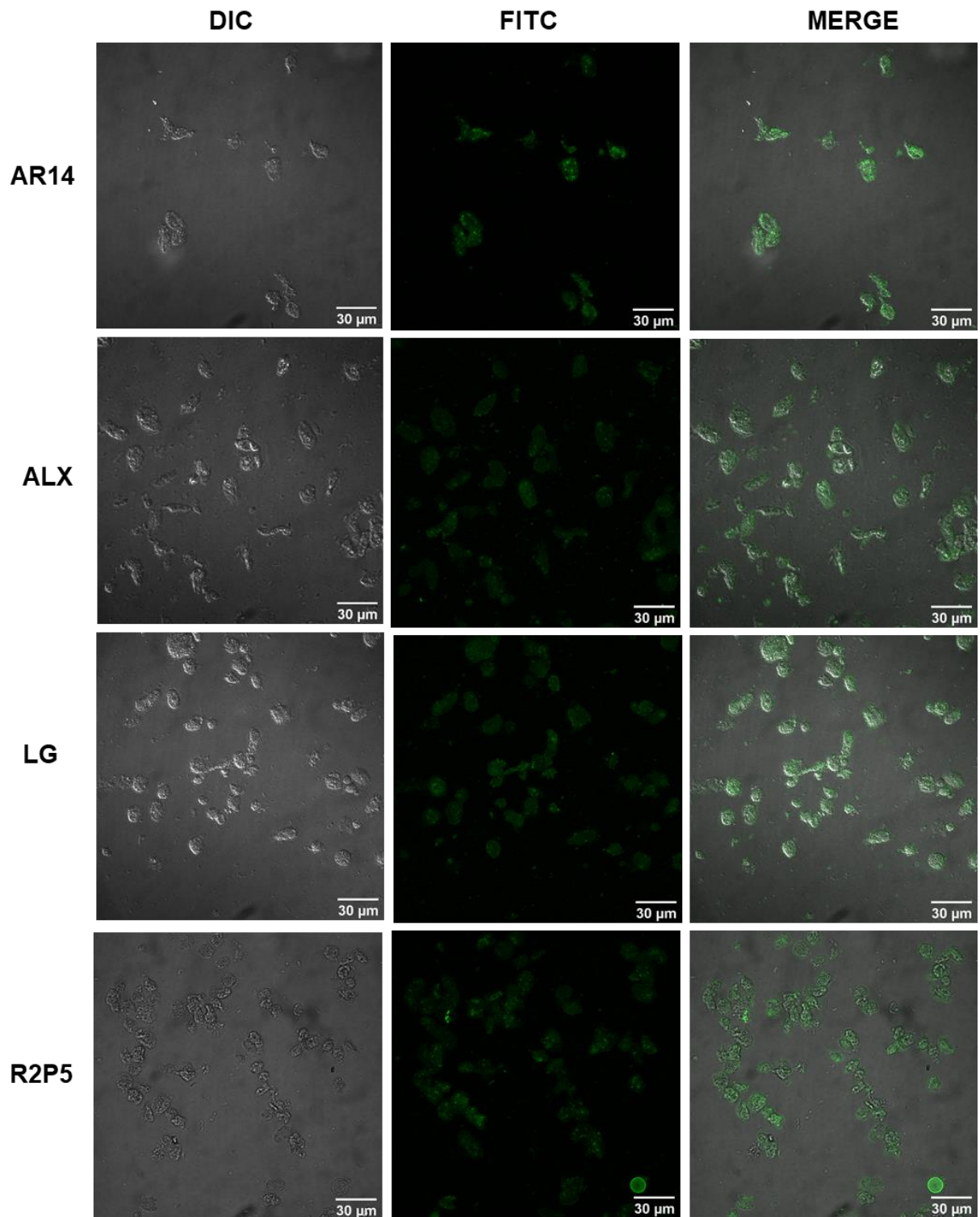


FIGURA 10. RECONHECIMENTO DE TROFOZOÍTOS DE *Acanthamoeba* PELO mAb3 POR IMUNOFLOURESCÊNCIA DIRETA. Trofozoítos dos isolados AR14, ALX, LG e R2P5 tratados com mAb3-FITC (20 µg/ml) analisados em microscopia confocal de fluorescência. A autofluorescência dos trofozoítos não tratados com anticorpo foi subtraída do sinal de fluorescência observado nas imagens. FONTE: A autora (2019).

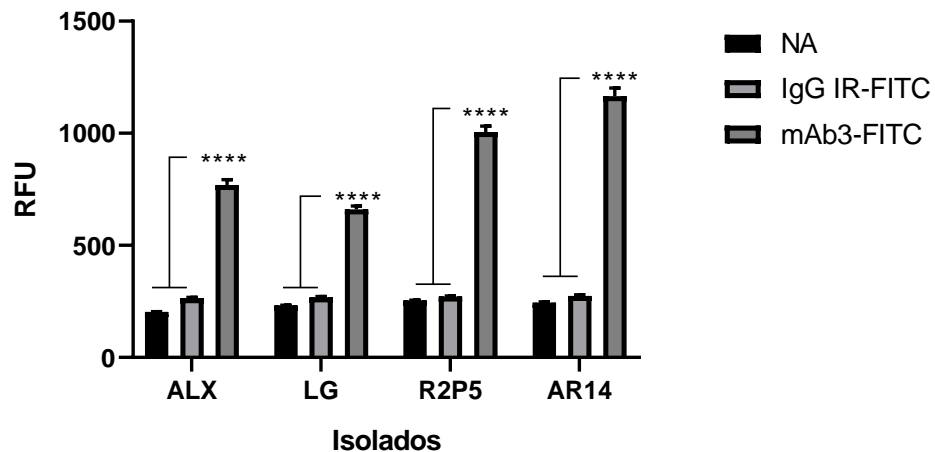


FIGURA 11. QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA REPRESENTANDO O RECONHECIMENTO DE TROFOZOÍTOS DE *Acanthamoeba* PELO mAb3 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA. Fluorescência dos trofozoítos de AR14, ALX, LG e R2P5 - não tratados com anticorpo (NA), tratados com IgG irrelevante-FITC (IgG IR-FITC) (20 µg/ml) e com mAb3-FITC (20 µg/ml) - analisados em microscopia confocal, quantificada em unidades relativas de fluorescência (RFU). Dados apresentados correspondem à média ± erro padrão, n = 100, **** p < 0,0001. FONTE: A autora (2019).

5.4 PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE ENCISTAMENTO

Foi desenvolvido um ensaio para avaliação da cinética de encistamento de *Acanthamoeba*, em meio Neff, padronizado em placas de cultivo de modo a favorecer a observação e manutenção da morfologia dos estágios de encistamento (FIGURA 12) durante o processo sem a necessidade de recuperar as células. Com base nos trabalhos de Khunkitti et al. (1998) e Chávez-Munguía et al. (2013), as *Acanthamoeba* nas quais se identificava presença de acantapódios eram classificadas como trofozoítos, aquelas com morfologia esférica e parede lisa, cistos imaturos e cistos maduros quando era observada formação de parede dupla.

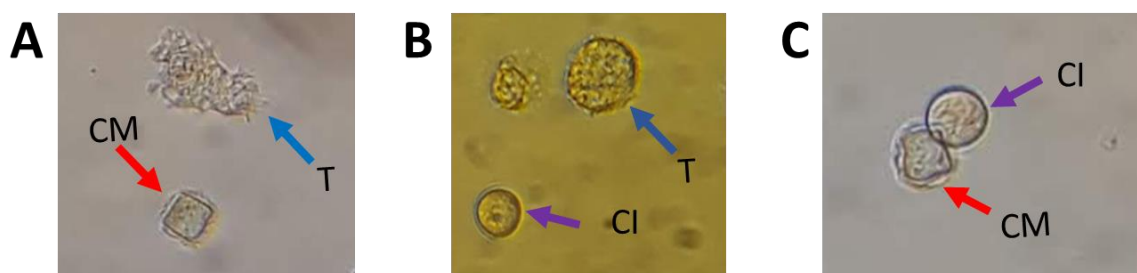


FIGURA 12. DIFERENTES ESTÁGIOS DE ENCISTAMENTO DE *Acanthamoeba*. Isolado AP2 em forma de trofozoíto (T, seta azul) (A, B), cisto imaturo (CI, seta roxa) (B, C) e cisto maduro (CM, seta vermelha) (A, C). FONTE: A autora (2019).

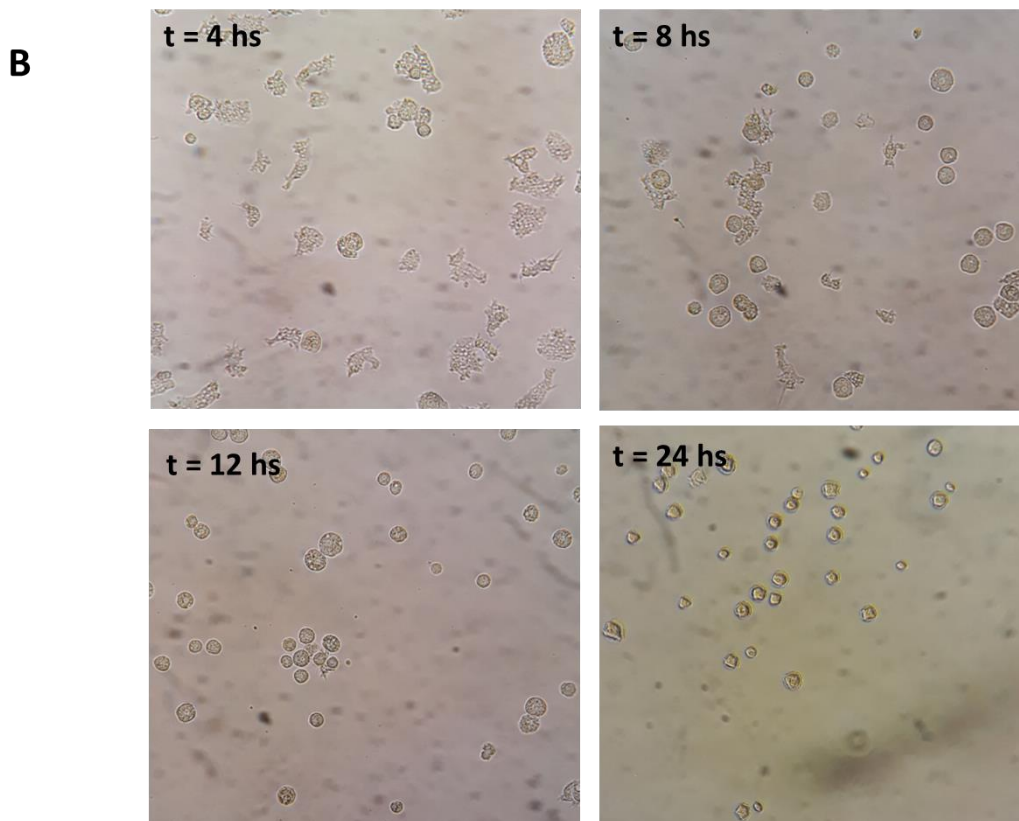
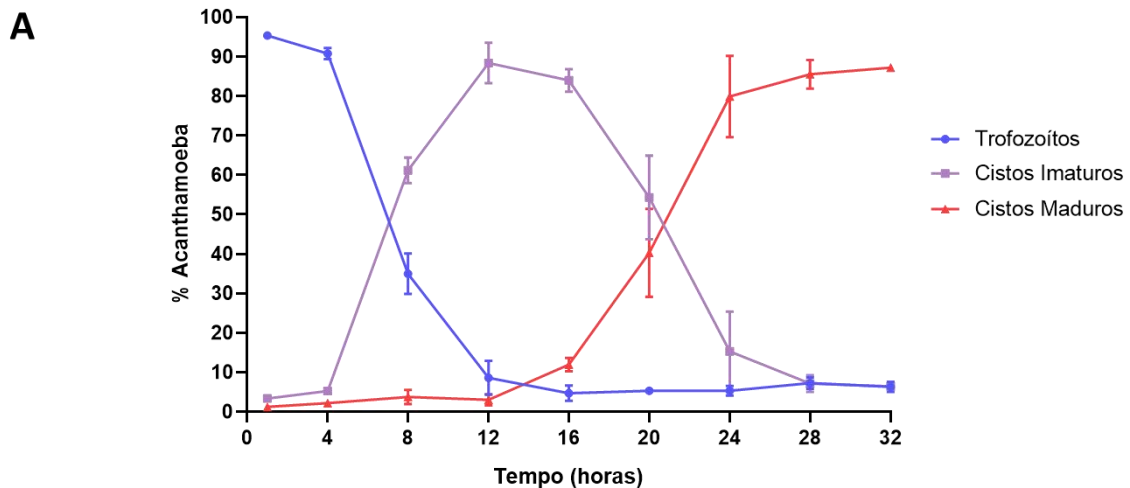


FIGURA 13. PERFIL DE ENCISTAMENTO DE DO ISOLADO AP2 DE *Acanthamoeba*. Curva de encistamento do isolado AP2, realizado em placa de 24 poços (A), resultados correspondem à junção de 2 experimentos independentes para construção da curva no período de 32 horas. Pontos no gráfico correspondem à média \pm desvio padrão, $n=4$ (tempos 1, 12 e 24 horas), $n=2$ (tempos 4,8,16, 20, 28 e 32 horas). Microscopia de luz das *Acanthamoeba* em diferentes tempos durante o ensaio de encistamento (B) FONTE: A autora (2019).

O resultado da cinética de encistamento do isolado AP2 mostra, segundo a FIGURA 13A, inicialmente uma porcentagem alta de trofozoítos, a qual diminui gradualmente na mesma proporção em que se observa um aumento do número de cistos imaturos, o qual atinge um pico após aproximadamente 12 horas de

experimento, e começa a decrescer conforme tem-se um aumento na porcentagem de cistos maduros, que atinge um valor máximo por volta das 24 horas e, aparentemente, mantém um *plateau* nas horas seguintes. Na FIGURA 13B, tem-se exemplificada a progressão do encistamento conforme observado em microscopia.

Interessantemente, este perfil de encistamento foi muito similar ao que foi reportado por Khunkitti et al. (1998), entretanto nota-se que no presente trabalho, com o protocolo proposto, foi observado encistamento máximo em apenas 24 horas de ensaio, enquanto outros trabalhos na literatura que realizaram indução de encistamento em meio Neff, tiveram os mesmos resultados após 54 (DA ROCHA-AZEVEDO et al., 2007), 96 (BECKER-FINCO et al., 2013) e até 144 horas (KHUNKITTI et al., 1998). Assim, o protocolo proposto neste trabalho possivelmente reproduz de forma mais fidedigna o encistamento mais rápido que provavelmente ocorre em condições reais, nas quais o trofozoíto se transforma em sua forma resistente após exposição aos fármacos utilizados para o tratamento da CA (KOVACS et al., 2015).

5.5 EFEITO DO mAb3 SOBRE O ENCISTAMENTO DE *Acanthamoeba*

Tendo em vista a importante função de regulação fisiológica da suposta proteína alvo do mAb3, um transportador CPA2 (FUJISAWA et al, 2007; CHANROJ et al, 2012), foi avaliado um possível efeito que o mAb3 poderia ter sobre a cinética de encistamento, considerando a relevância deste processo no ciclo de vida das *Acanthamoeba*. Para isto, foi aplicado o protocolo padronizado de encistamento em 24 horas induzido por Neff, como anteriormente descrito. As *Acanthamoeba* no início do experimento foram tratadas: apenas com veículo (PBS); com mAb3 em diferentes concentrações; e com uma proteína irrelevante (Prot-IR) nas mesmas concentrações. Os poços foram observados nos tempos 4, 8, 12 e 24 horas, fazendo a contagem das *Acanthamoeba* conforme descrito previamente.

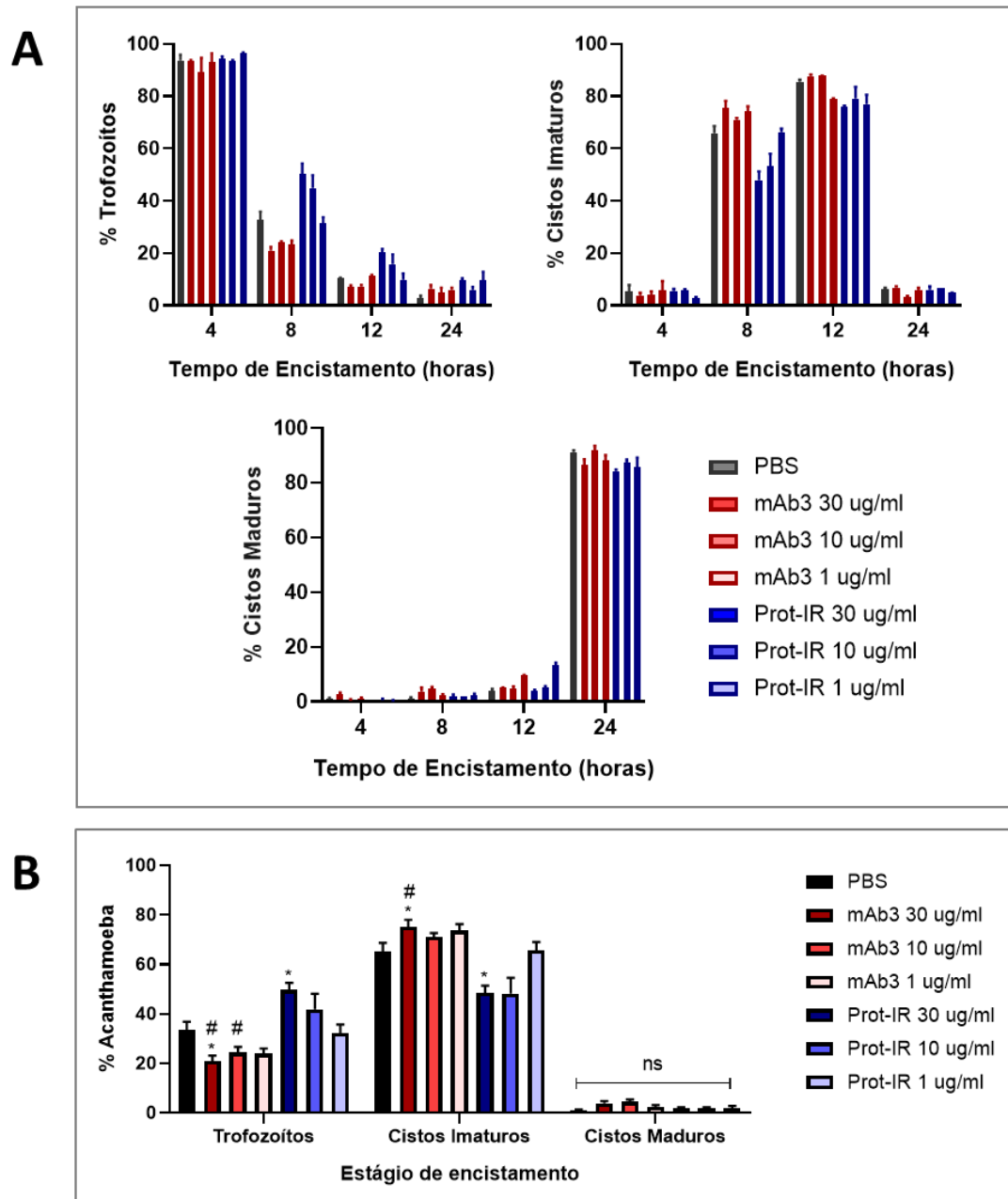


FIGURA 14. EFEITO DO mAb3 SOBRE A CINÉTICA DO ENCISTAMENTO DE AP2 APÓS 8 HORAS. Trofozoítos do isolado AP2 foram colocados em meio Neff de encistamento na presença do mAb3 (30, 10, 1 µg/ml), de uma proteína irrelevante (Prot-IR) (30, 10, 1 µg/ml) ou apenas de PBS, o veículo, estes foram observados nos tempos 4, 8, 12 e 24 horas e foi quantificada a porcentagem de trofozoítos, cistos imaturos e maduros de cada grupo (A). Comparação da porcentagem dos estágios de encistamento dos diferentes tratamentos no tempo 8 horas (B). Dados mostrados representam média ± erro padrão, n = 6, *p<0,05 vs NA, # p<0,05 vs Prot-IR de concentração correspondente, ns: não significante. FONTE: A autora (2019).

Em todos os tratamentos observou-se uma cinética de encistamento semelhante ao que havia sido descrito nos ensaios de padronização da curva de encistamento, com mudanças muito sutis entre os tratamentos dentro de cada um dos tempos observados (FIGURA 14A); no tempo 8 horas, entretanto, havia indícios de

alterações mais expressivas, o qual, por este motivo, foi analisado mais minuciosamente (FIGURA 14B).

Nota-se que o número de trofozoítos no poço tratado com mAb3 (30 µg/ml) diminuiu significativamente, e o número de cistos imaturos aumentou na mesma proporção, quando comparados aos grupos tratados com veículo e com a proteína irrelevante (30 µg/ml), e a porcentagem de trofozoítos tratados com mAb3 na concentração intermediária (10 µg/ml) também foi menor quando comparada ao controle de proteína irrelevante na mesma concentração (FIGURA 14B) - sugerindo que o mAb3 estaria acelerando o processo de encistamento. Por outro lado, observa-se também que existe diferença estatística entre o grupo tratado com veículo e o tratado com a proteína irrelevante com indícios de que esta estaria acelerando o processo de encistamento, mas em menor proporção. Para melhor demonstração desse efeito, outros controles (anticorpos irrelevantes) poderiam ser empregados e numa gama maior de concentrações, a fim de confirmar esse resultado.

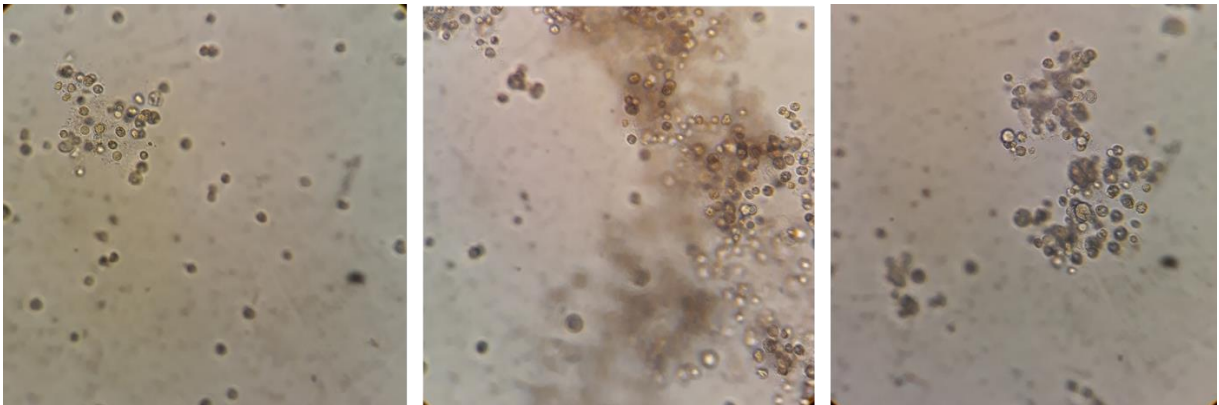


FIGURA 15. *DEBRIS* CELULARES OBSERVADOS NOS POÇOS TRATADOS COM mAb3. Observação em microscópio invertido da formação de estruturas com cistos emaranhados em *debris* celulares após 24 horas em poços com trofozoítos tratados com 30 µg/ml de mAb3. FONTE: A autora (2019).

Além disso, nos poços tratados com maior concentração de mAb3, após 24 horas, foi identificada presença de “agrupados de *debris* celulares” (FIGURA 15) sugerindo a ocorrência de morte de trofozoítos, fenômeno ausente em todos os outros tratamentos. O fato do mAb3 apresentar alguma toxicidade para os trofozoítos de *Acanthamoeba* seria uma justificativa para a aparente aceleração no processo de encistamento observado neste poço (FIGURA 14B) - um componente tóxico poderia de fato aumentar a velocidade de encistamento (KILVINGTON et al., 2008; KOVACS et al., 2015). Seria necessário o desenvolvimento de um experimento para avaliação

da citotoxicidade do mAb3 e viabilidade dos trofozoítos de *Acanthamoeba* para investigação desta hipótese.

5.6 MODELAGEM E DOCKING DO mAb3 E DA L8H7S3

A partir de dados de sequenciamento das porções variáveis de cadeia leve (VL) e pesada (VH) do mAb3 (LIMA, 2017), por meio do *software* Modeller com interface com UCSF Chimera, através de modelagem por homologia (como *template* foi utilizada a estrutura 5A2I - conforme registrado no RCSB PDB *Protein Data Bank*) foram gerados 1000 modelos e aquele com *score* zDOPE mais negativo - o qual foi o modelo número 269 com zDOPE de -1,37 - foi selecionado para otimização. A qualidade do modelo foi avaliada pelo servidor MolProbity, no qual foram observados principalmente os *outliers* do diagrama de Ramachandran. Inicialmente foram identificados 5 *outliers*, cuja correção foi feita pelo UCSF Chimera, pela função de remodelagem de alças e obteve-se um modelo final denominado VHL_mAb3_opt (FIGURA16) com 1 *outlier* (Gly99).

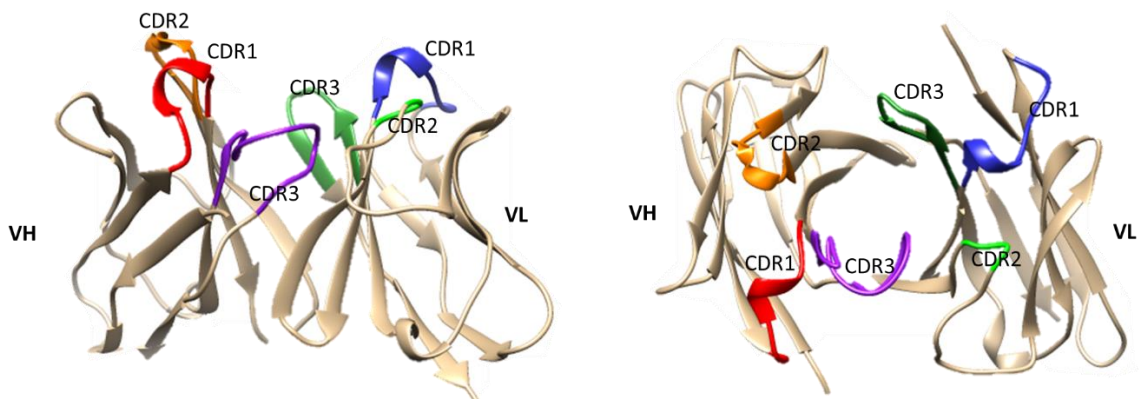


FIGURA 16. MODELO MOLECULAR DA DO VH E VL DO mAb3 (VHL_mAb3_opt). ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PORÇÃO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA (VH) E LEVE (VL) DO mAb3. Indicadas as regiões de CDR da cadeia pesada (vermelho, laranja e roxo) e leve (azul, verde claro e verde escuro), conforme o menu de cores do IMGT (ImMunoGeneTics). FONTE: A autora (2019).

Com relação à proteína alvo, utilizou-se a sequência aminoacídica da proteína L8H7S3 (UniProt), na qual foram encontrados, pela ferramenta BLASTP, os peptídeos mais abundantes obtidos na análise de espectrometria de massas da proteína alvo purificada do mAb3.

Como anteriormente mencionado, as proteínas da família CPA2 em eucariotos não são bem caracterizadas, devido a este fato, nota-se até o presente momento a ausência de estruturas cristalizadas no RCSB PDB *Protein Data Bank* com *coverage* da proteína completa para serem utilizadas como *template*. Por este motivo, a modelagem da proteína completa (999 aminoácidos) foi realizada através do servidor Phyre2, o qual utilizou uma abordagem de *templates* múltiplos (FIGURA 17B), sendo que 329 resíduos foram modelados *ab initio*, uma estratégia por vezes questionada pela redução a confiabilidade do modelo (NIKOLAEV et al., 2018), mas de modo geral 59% da sequência da proteína foi modelada com confiabilidade maior que 90% (FIGURA 17A).

Para otimização do modelo da proteína L8H7S3 gerado pelo Phyre2, este foi analisado pelo servidor MolProbity e foram identificados 110 *outliers* do diagrama de Ramachandran, os quais foram reduzidos a 20 pelo servidor de minimização de energia YASARA; e pela função de remodelagem de alças do UCSF Chimera, foi possível obtenção de um modelo final denominado L8H7S3_Phyre2_opt com apenas 2 *outliers* (Ala210 e Asp 607).

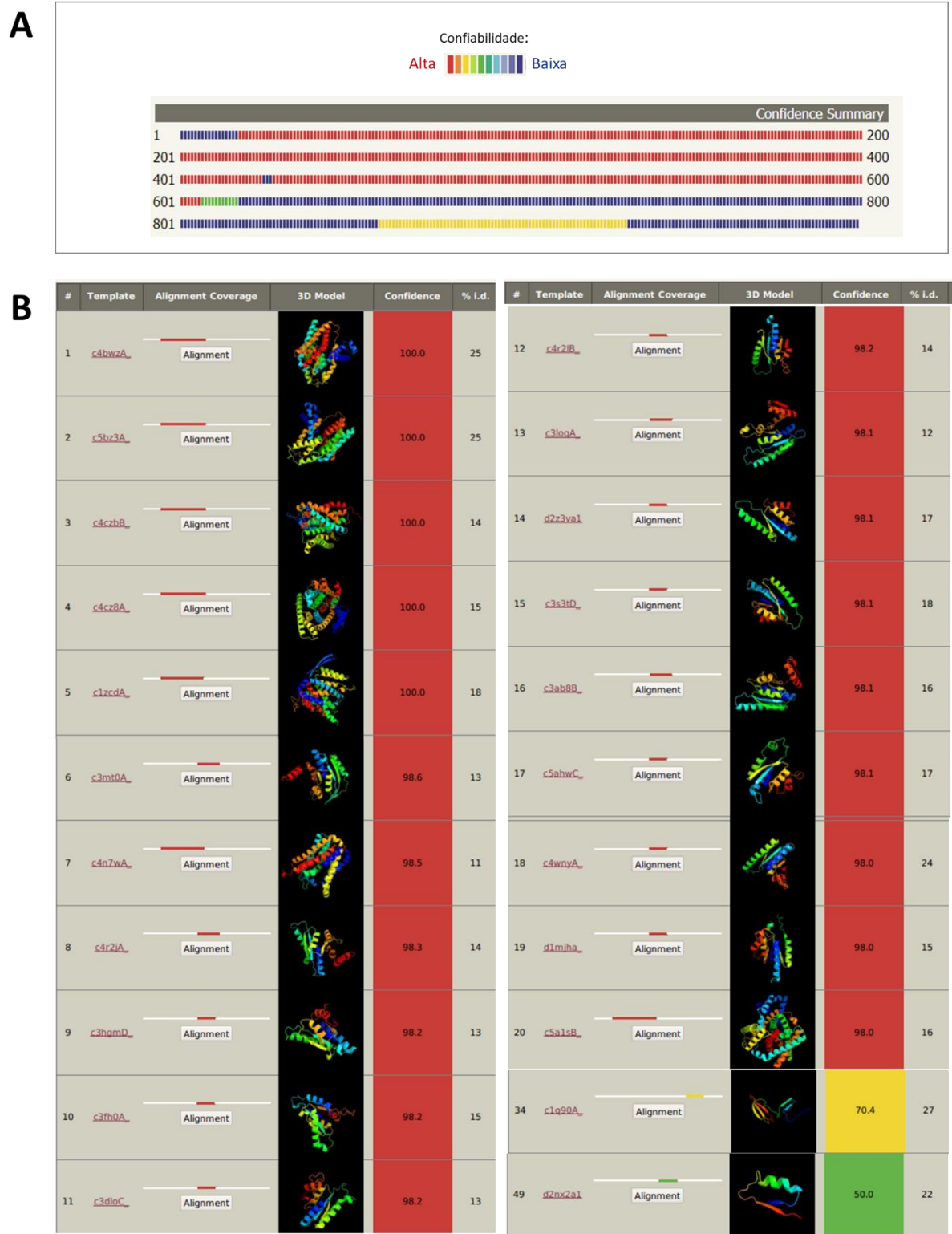


FIGURA 17. INFORMAÇÕES SOBRE A MODELAGEM DA PROTEÍNA L8H7S3 PELO SERVIDOR PHYRE2. Grau de confiabilidade da modelagem do transportador CPA2 L8H7S3 de *Acanthamoeba* realizado pelo servidor Phyre2 (A) e lista de *templates* utilizados na modelagem com a região de *coverage*, grau de confiabilidade e porcentagem de identidade com a sequência modelada (B). FONTE: Phyre2 (2019).

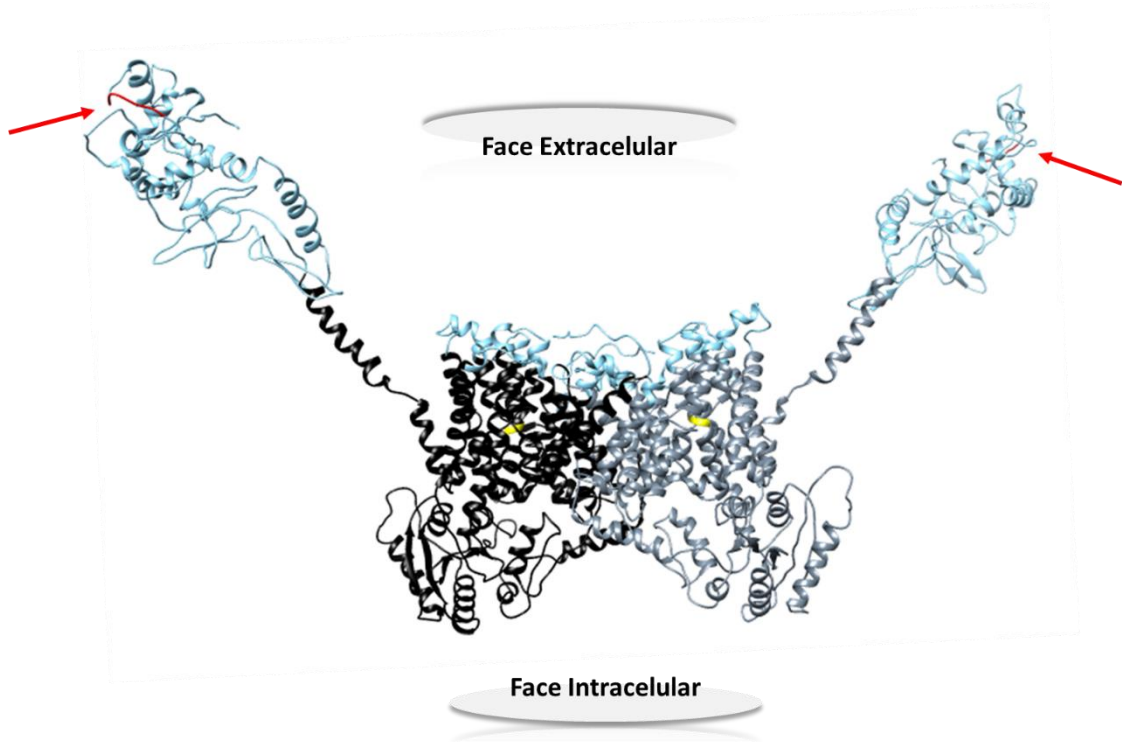


FIGURA 18. MODELO MOLECULAR DA PROTEÍNA L8H7S3 DA FAMÍLIA CPA2 DE *Acanthamoeba* (L8H7S3_Phyre2_opt) EM FORMA DIMÉRICA. Indicados os domínios extracelulares em azul claro (conforme previsão do servidor Phyre2), em vermelho a sequência correspondente ao peptídeo identificado na análise de espectrometria de massas da proteína alvo do mAb3. FONTE: A autora (2019).

Em seguida através do servidor ClusPro foram gerados vários modelos de *docking* entre o VHL_mAb3_opt e o L8H7S3_Phyre2_opt, dentre estes foram analisados os 10 com melhor *weighted score*, calculado pelo ClusPro, que quantifica o quão energeticamente favorável são estes modelos.

Como sabe-se que o mAb3 reconhece seu alvo em região extracelular através dos experimentos de imunofluorescência e citometria de fluxo feitos sem permeabilização, todos os modelos de *docking* nos quais o VHL_mAb3_opt interagiu com o alvo em alguma região que não correspondia aos domínios extracelulares do L8H7S3_Phyre2_opt (preditos pelo Phyre2) (FIGURA 18) foram descartados, restando apenas 3 modelos (02, 03 e 09).

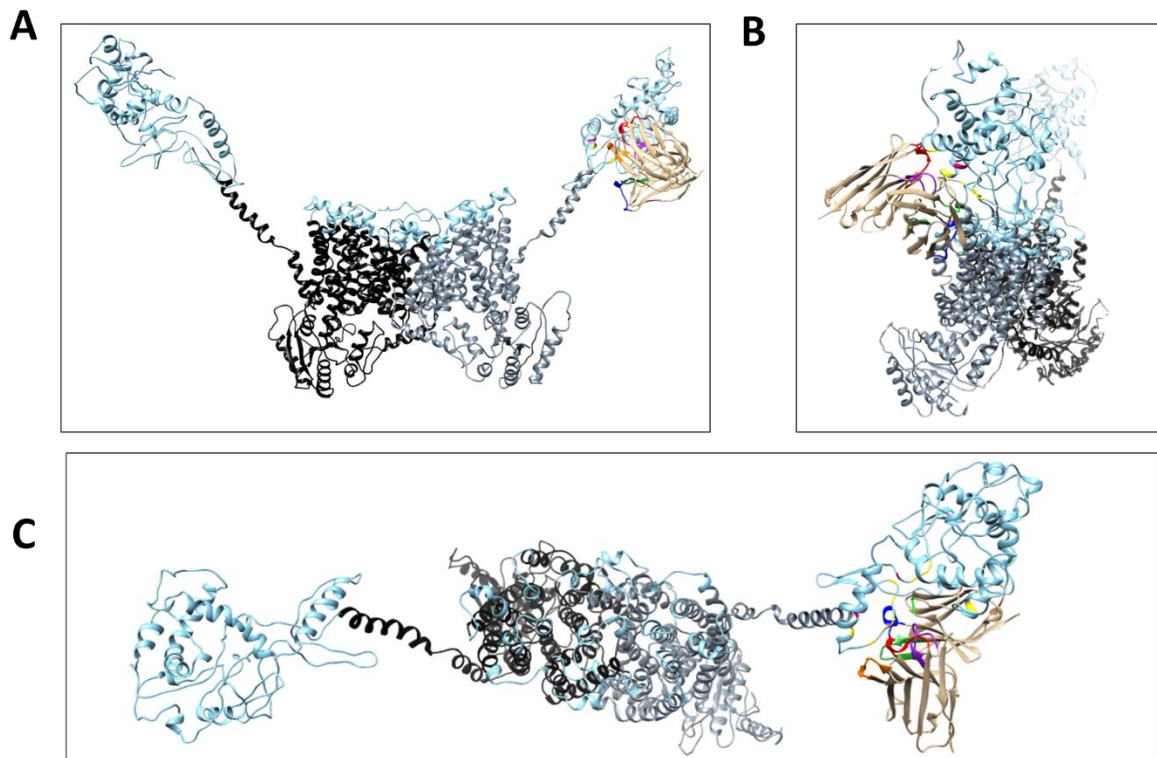


FIGURA 19. MODELO MOLECULAR DE *DOCKING* DA PROTEÍNA L8H7S3 COM VH E VL DO mAb3. Modelo 03 do *docking* realizado pelo servidor ClusPro da proteína L8H7S3 dimérica (em preto e cinza, com domínios extracelulares em azul claro) com as porções leve e variável do mAb3 (em bege com as regiões de CDR coloridas conforme indicado na FIGURA 15), observado em visão frontal (A), lateral (B) e superior (C). FONTE: A autora (2019).

Considerando dados anteriores realizados pelo grupo (LIMA, 2017) quanto à probabilidade da interação do mAb3 com seu alvo ser dependente de N-glicosilação, e resultados que sugerem que o sítio de ligação esteja próximo ao peptídeo identificado nas análises de espectrometria de massas do alvo do mAb3, com base nesses dois critérios, foi selecionado o modelo de *docking* 03, que apresenta duas asparaginas, Asn850 e Asn888 - respectivamente com 62% e 53% de potencial de sofrerem N-glicosilação (predição pelo NetNGlyc 1.0) - estruturalmente próximas ao sítio de interação das moléculas (FIGURA 20C). Além disso, este modelo de *docking* foi o que apresentou maior proximidade, na sequência aminoacídica, entre o peptídeo encontrado na espectrometria de massas e os aminoácidos na interação antígeno/anticorpo.

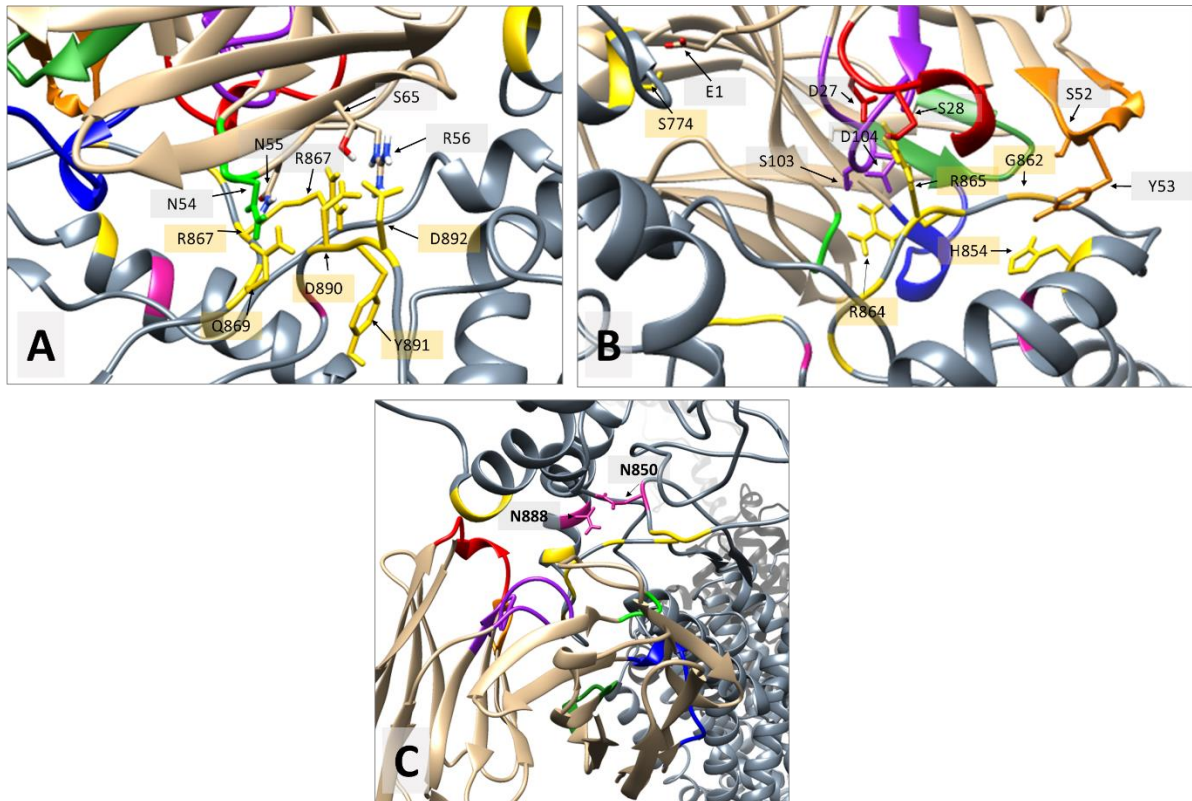


FIGURA 20. AMINOÁCIDOS NA REGIÃO DE CONTATO ENTRE A L8H7S3 E O VH E VL DO mAb3 NO MODELO DE *DOCKING* 03. Aminoácidos diretamente envolvidos na interação da porção variável (A) e leve (B) do mAb3 (caixas cinza) com o alvo (caixas amarelas), conforme preditos pelo PDBSum no modelo de *docking* 03 gerado pelo ClusPro, e asparaginas com potencial acima de 50% de sofrerem N-glicosilação próximas a essa região (C). FONTE: A autora (2019).

As análises dos resíduos de aminoácidos envolvidos na interação entre o VHL_mab3_opt e o L8H7S3_Phyre2_opt no modelo de *docking* 03 (FIGURAS 20A e 20B) foram feitas pelo PDBSum, o qual identificou entre o VH e o alvo 10 pontes de hidrogênio e 2 pontes salinas, e entre o VL e o alvo, 9 pontes de hidrogênio e 2 pontes salinas (TABELA 2). O número destes tipos de interações não covalentes corrobora os resultados de ELISA previamente obtidos (FIGURA 5) que sugerem alta afinidade entre o mAb3 e seu alvo.

Por outro lado, deve-se considerar que, os dados apresentados, por serem análises *in silico* de predição de estrutura e interação de moléculas, servem como ferramenta especulativa no auxílio do entendimento destas estruturas e como estas poderiam se relacionar umas com as outras. Estes devem, portanto, sempre ser embasados por outros dados experimentais que os complementem.

Assim, estes resultados sugerem uma possível região exposta específica na molécula alvo, que pode corresponder ao epítipo do mAb3. Assim, ensaios de mapeamento de epítipos (*in vitro* e *in silico*) poderiam ser empregados para

confirmação dessa região como alvo de interação com o anticorpo (ABBOTT et al., 2014).

TABELA 2. INTERAÇÕES MOLECULARES ENTRE AMINOÁCIDOS NO MODELO DE DOCKING 03.

Interações entre L8H7S3 VH mAb3			Interações entre L8H7S3 VL mAb3		
Pontes de Hidrogênio			Pontes de Hidrogênio		
Resíduo L8H7S3	Resíduo VH mAb3	Distância (Å)	Resíduo L8H7S3	Resíduo VL mAb3	Distância (Å)
Arg865	Asp27	2,76	Asp892	Ser65	2,88
Arg865	Asp27	2,77	Tyr891	Arg56	2,84
Arg865	Ser28	2,78	Asp892	Arg56	2,78
Ser774	Glu1	3,16	Asp890	Arg56	2,81
Ser774	Glu1	2,89	Asp890	Arg56	3,00
Arg864	Ser103	2,67	Asp890	Arg56	2,96
Arg864	Asp104	2,80	Arg867	Arg56	2,75
His854	Tyr53	2,83	Gln869	Asn54	2,99
Gly862	Tyr53	2,67	Gln869	Asn55	2,99
Gly862	Ser52	3,13			
Pontes Salinas			Pontes Salinas		
Arg865	Asp207	2,76	Asp892	Arg56	2,78
Arg864	Asp104	2,80	Asp890	Arg56	2,81

Tipos de interações moleculares entre resíduos de aminoácidos envolvidos na interface do VHL_mab3_opt com o L8H7S3_Phyre2_opt no modelo de *docking* 03 e a distância entre eles em angstroms (Å). FONTE: A autora (2019).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dado o número crescente de usuários de lentes de contato, com consequente aumento do número de casos de ceratite por *Acanthamoeba*, além das dificuldades atualmente enfrentadas quanto ao manejo desta infecção, torna-se necessário o desenvolvimento de bioferramentas que possam ser empregadas no diagnóstico precoce dessa patologia para condução da terapêutica mais adequada. Nesse sentido, a produção de anticorpos monoclonais específicos para este patógeno pode contribuir para o estudo e detecção de *Acanthamoeba*, proporcionando melhorias nas técnicas atualmente empregadas.

Neste estudo foi possível concluir que o mAb3 foi capaz de identificar trofozoítos de diferentes isolados de *Acanthamoeba* tanto por imunofluorescência quanto por citometria de fluxo, apresentando um potencial de aplicação no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico para ceratite amebiana através de um protocolo de detecção direta.

Neste trabalho foi também desenvolvido um protocolo rápido de encistamento, induzido em meio Neff, realizado em placas de cultivo. Com relação ao efeito do mAb3 sobre o processo de encistamento, outros experimentos são necessários para obtenção de resultados mais conclusivos, entretanto foram identificados indícios de um efeito citotóxico do mAb3 sobre trofozoítos de *Acanthamoeba*, sugerindo um potencial uso do mAb3 no tratamento da ceratite amebiana.

Quanto à caracterização imunoquímica, através dos resultados de titulação do mAb3 por ELISA, pode-se inferir que este apresenta alta afinidade pela sua proteína alvo, e o perfil de reconhecimento do mAb3 por *western blot* parece ser diferenciado entre os isolados de diferentes origens.

E, por fim, em ensaios *in silico*, foi possível a construção de modelos moleculares para as porções variáveis de cadeia leve e pesada do mAb3 e para o transportador CPA2 de *Acanthamoeba* L8H7S3, provável proteína alvo do anticorpo. Através destes, foi selecionado um modelo de *docking* o qual sugere um possível sítio de interação entre ambos. Apesar das dificuldades na modelagem da proteína alvo, estes resultados eventualmente poderiam ser relevantes no estudo destes transportadores em eucariotos.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. M.; DAMSCHRODER, M. M.; LOWE, D. C. Current approaches to fine mapping of antigen-antibody interactions. **Immunology**, v. 142, n. 4, p. 526–535, 2014.

ALVES, D. F. et al. Métodos de diagnóstico para a doença de Chagas: uma atualização. **RBAC**, v. 50, n. 4, p. 330-333, 2018.

ANWAR, A.; KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. Combating *Acanthamoeba* spp. cysts: what are the options? **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 26, 2018.

BARBOSA, R. N. P. et al. Novas evidências sobre o valor diagnóstico da reação de imunofluorescência indireta e reação intradérmica de hipersensibilidade tardia na infecção humana por *Leishmania (L.) infantum chagasi* na Amazônia, Brasil. **Rev. Pan-Amaz Saude**, v. 1, n.1, 2010.

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, 2013.

BEHERA et al. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from *Acanthamoeba* meningitis/ meningoencephalitis (AME) patients in India. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 442, p. 1-6, 2016.

BOOTON G. C. et al. Identification and Distribution of *Acanthamoeba* Species Genotypes Associated with Non-keratitis Infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 4, p. 1689–1693, 2005.

BOUER, A. Detecção de anticorpos anti-Toxoplasma gondii por meio das técnicas de Imunofluorescência Indireta e ELISA Indireto em primatas experimentalmente e naturalmente infectados. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.19, n. 1, 2010

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRENKE, R.; HALL, D. R.; CHUANG, G.-Y.; et al. Application of asymmetric statistical potentials to antibody-protein docking. **Bioinformatics**, v. 28, n. 20, p. 2608–2614, 2012.

CAO, Z.; JEFFERSON, D. M.; PANJWANI, N. Role of Carbohydrate-mediated Adherence in Cytopathogenic Mechanisms of *Acanthamoeba*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15838-15845, 1998.

CHAROJ, S. et al. Conserved and diversified gene families of monovalent cation/H⁺ antiporters from algae to flowering plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. 25, p. 1-18, 2012

CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; SALAZAR-VILLATORO, L.; LAGUNES-GUILLÉN, A.; et al. *Acanthamoeba castellanii* cysts: new ultrastructural findings. **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1125–1130, 2013.

CLARKE, B.; SINHA, A.; PARMAR, D. N.; SYKAKIS, E. Advances in the Diagnosis and Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis. **Journal of Ophthalmology**, v. 2012, 2012.

CLARKE, D. W.; NIEDERKORN, J.Y. et al. The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 5, p. 1400-1405, 2006.

CORRIPIO, I. F.; CISNEROS, M. J. G.; ORMAECHEA, T. G. Diagnóstico de las parasitosis intestinales mediante detección de coproantígenos. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 28, p. 33-39, 2010.

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). **Parasitol Res.**, v. 114, p. 2481-2490, 2015.

COSTA, A. O. et al. Molecular diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis: evaluation in rat model and application in suspected human cases. **Parasitology Research**, v. 116, n. 4, p. 1339–1344, 2017.

DA 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, n. 5, p. 441–449, 2007.

DELMONTE, O. M.; FLEISHER, T. A. Flow cytometry: Surface markers and beyond. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 2, p. 528–537, 2019.

DUARTE, J. L., et al. 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.

EPSTEIN, R. J.; WILSON, L. A.; VISVESVARA, G. S.; PLOURDE, E. G. Rapid Diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis From Corneal Scrapings Using Indirect Fluorescent Antibody Staining. **Archives of Ophthalmology**, v. 104, n. 9, p. 1318–1321, 1986.

FUJISAWA, M.; ITO, M.; KRULWICH, T. Three two-component transporters with channel-like properties have monovalent cation/proton antiport activity. **PNAS**, v. 104, n. 33, p. 13289-13294, 2007.

GARATE, M.; CUBILLOS, I.; MARCHANT, J.; PANJWANI, N. Biochemical characterization and functional studies of *Acanthamoeba* mannose-binding protein. **Infection and Immunity**. v. 73, n. 9, p. 5775-5781, 2005.

GLÓRIA, J. C. Métodos para diagnóstico de Malária: Atualização e desafios, **Scientia Amazonia**, v. 7, n.2, 2018.

GOMES, Y. M. Diagnóstico. Portal da Doença de Chagas, 2017. Disponível em:<<http://chagas.fiocruz.br/diagnostico/>>. Acesso em: 13/06/2019.

GONZALEZ-ROBLES, A.; SALAZAR-VILLATORO, L.; OMAÑA-MOLINA, M.; LORENZO-MORALES, MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Acanthamoeba royreba*: morphological features and in vitro cytopathic effect. **Experimental Parasitology**. v. 133, n. 4, p. 369-375, 2013.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, D. et al. Evaluation of the sensitivity to chlorhexidine, voriconazole and itraconazole of T4 genotype *Acanthamoeba* isolated from Mexico. **Experimental Parasitology**, v. 197, p. 29-35, 2019.

KANG, A.-Y.; PARK, A.-Y.; SHIN, H.-J.; et al. Production of a monoclonal antibody against a mannose-binding protein of *Acanthamoeba culbertsoni* and its localization. **Experimental Parasitology**, v. 192, p. 19–24, 2018.

KARLOVA, M. G.; VOSKOBOYNIKOVA, N.; GLUHOV, G. S.; et al. Detergent-free solubilization of human Kv channels expressed in mammalian cells. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 219, p. 50–57, 2019.

KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, p. 845-858, 2015.

KHAN, N. A.; JARROLL, E.L.; PANJWANI, N.; CAO, Z.; PAGET, T.A. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, n. 8, p. 2858-2861, 2000.

KHAN, N. A.; GREENMAN, J.; TOPPING, K. P.; et al. Isolation of *Acanthamoeba*-Specific Antibodies from a Bacteriophage Display Library. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2374–2377, 2000.

KHUNKITTI W.; LLOYD, D.; FURR, J. R.; RUSSELL, A. D. *Acanthamoeba castellanii*: Growth, Encystment, Excystment and Biocide Susceptibility. **Journal of Infection**, v. 36, p. 43-48, 1998.

KILVINGTON, S.; HEASELGRAVE, W.; LALLY, J. M.; AMBRUS, K.; POWELL, H. Encystment of *Acanthamoeba* During Incubation in Multipurpose Contact Lens Disinfectant Solutions and Experimental Formulations: Eye & Contact Lens. **Science & Clinical Practice**, v. 34, n. 3, p. 133–139, 2008.

KOVACS, C.; RAH, M.; LYNCH, S.; MILLARD, K.; MORRIS, T. *Acanthamoeba* encystment: multifactorial effects of buffers, biocides, and demulcents present in contact lens care solutions. **Clinical Ophthalmology**, v. 9, p. 1905-1913, 2015.

KOZAKOV, D. et al. The ClusPro web server for protein-protein docking. **Nature Protocols**, v. 12, n. 2, p. 255–278, 2017.

KRIEGER, E. et al. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. **Proteins**, v. 77, suplemento 9, p. 114-22, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LARKIN D. F. P.; BERRY, M.; EASTY, D. L. In Vitro Corneal Pathogenicity of *Acanthamoeba*. **Eye**. v. 5, p. 560-568, 1991.

LIMA, M. M. W et al. Avaliação Imunoquímica e da Ativação de Sistema Complemento de diferentes isolados de *Acanthamoeba*. 56 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, 2017.

LLOYD, D. Encystment in *Acanthamoeba castellanii*: A review. **Experimental Parasitology**, v. 145, suplemento, p. 20-27, 2014.

LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, v. 22, n. 10, p. 1-20, 2015.

MACIVER, S. K., et al. 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.

MAGNET, A.; GALVÁN, A. L.; FENOY, S.; et al. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 383–392, 2012.

MANDON, E. D.; AGEZ, M.; PELLEGRIN, R.; IGONET, S.; JAWHARI, A. Novel systematic detergent screening method for membrane proteins solubilization. **Analytical Biochemistry**, v. 517, p. 40–49, 2017.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clin. Microbiol.**, v.16, p. 273-307, 2003.

MAUBON, D. et al. A One-Step Multiplex PCR for *Acanthamoeba* Keratitis Diagnosis and Quality Samples Control. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 53, n. 6, p. 2866, 2012.

MERGERYAN, H. The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. **Rev. Infect. Dis**, v. 13, p. 390-391, 1991.

MOREIRA, M. A. B. et al. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 39, n. 2, p. 103-106, 2002.

MUINAO, T.; PAL, M.; BORUAH, H. P. D. Cytosolic and Transmembrane Protein Extraction Methods of Breast and Ovarian Cancer Cells: A Comparative Study. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 29, n. 3, p. 71–78, 2018.

NEELAM, S.; NIEDERKORN, J. Y. Pathobiology and Immunobiology of *Acanthamoeba* Keratitis: Insights from Animal Models. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 20, p. 261-268, 2017.

NIKOLAEV, D. M.; SHTYROV, A. A.; PANOV, M. S.; et al. A Comparative Study of Modern Homology Modeling Algorithms for Rhodopsin Structure Prediction. **ACS Omega**, v. 3, n. 7, p. 7555–7566, 2018.

NG, S. et al. *Acanthamoeba*-mediated cytopathic effect correlates with MBP and AhLBP mRNA expression. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 625, p. 1-14, 2017.

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

PAGE, F. C. Rosculus ithacus Hawes, 1963 (Amoebida, Flabellulidae) and the Amphizoic Tendency in Amoebae. **Acta Protozool.**, v. 13, p. 143-154, 1974.

PALONI, M.; CAVALLOTTI, C. Molecular Modeling of the Affinity Chromatography of Monoclonal Antibodies. In: Reichelt, S. (Ed). **Affinity Chromatography: Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press, v. 1286, p. 321-335, 2015.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; et al. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

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.

POSSAMAI, C.O.; LOSS, A. C. COSTA, A. O.; FALQUETO, A.; FURST, C. *Acanthamoeba* of three morphological groups and distinct genotypes exhibit variable and weakly inter-related physiological properties. **Parasitology Research**, v. 117, p. 1389–1400, 2018.

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

RIVERA, F. et al. Pathogenic amoeba in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. **Environ. Res.** v. 50, p. 289-295, 1989.

SÁNCHEZ, A. G. C.; VIRGINIO, V. G.; MASCHIO, V. J.; FERREIRA, H. B.; ROTT, M. B. Evaluation of the immunodiagnostic potential of a recombinant surface protein domain from *Acanthamoeba castellanii*, **Parasitology**, v. 143 , n.12, p. 1656-1664, 2016.

SCHEID, P. L.; BALCZUN, C. Failure of molecular diagnostics of a keratitis-inducing *Acanthamoeba* strain. *Experimental Parasitology*, v. 183, p. 236–239, 2017.

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

SILVA, R. M. et al. Análise TG-ROC de testes de imunofluorescência no diagnóstico de leishmaniose visceral canina. **Rev. Saúde Pública**, v. 43, n. 6, 2009.

STAPLETON, F. et al. Contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis. **Optom Vis Sci.** v. 86, n. 10, 2009.

STRATFORD, M. P.; GRIFFITH, A. J. 1978. Variations in the properties and morphology of cysts of *Acanthamoeba castellanii*. **J. Gen. Microbiol**, v. 108, p. 33, 1978.

SZENTMÁRY, N.; DAAS, L.; SHI, L.; LAURIK, K. L.; LEPPER, S.; MILIOTI, G.; SEITZ, B. *Acanthamoeba* keratitis – Clinical signs, differential diagnosis and treatment. **Journal of Current Ophthalmology**, v. 31, n. 1, p. 16-23, 2019.

TAKAOKA-SUGIHARA, N., et al. Cytopathic effect of *Acanthamoeba* on human corneal fibroblasts. **Molecular Vision**, v. 18, p. 2221-2228, 2012.

TRABELSI, H., et al. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. **Pathol Biol.**, v. 60, n. 6, p. 399-405, 2012.

TURNER, M. L.; COCKERELL, E. J.; BRERETON, H. M.; et al. Antigens of selected *Acanthamoeba* species detected with monoclonal antibodies. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 9, p. 981–990, 2005.

UEHLINGER, F. D. et al. . Comparison of five diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in fecal samples from young dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p. 91-96, 2017.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **Immunol Med Microbiol.**,v. 50, p. 1-26, 2007.

WALOCHNIK, J.; HALLER-SCHÖBER, 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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p.3932-3936, 2000.

XIANG, M. et al. A human Na/H antiporter sharing evolutionary origins with bacterial NhaA may be a candidate gene for essential hypertension. **PNAS**, v. 104, n. 47, p. 18677–18681, 2007.

ZHAO, Z. et al. Crystal Structure and Computational Modeling of the Fab Fragment from a Protective Anti-Ricin Monoclonal Antibody, **PLOS One**, v. 7, n. 12, p. 1-10, 2012.