

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIOVANA C S RIBEIRO

AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS FRENTE A *Acanthamoeba* spp.. NA
PRESENÇA DE ANTICORPO ESPECÍFICO

CURITIBA

2024

GIOVANA C S RIBEIRO

AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS FRENTE A *Acanthamoeba* spp. NA
PRESENÇA DE ANTICORPO ESPECÍFICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado 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

Orientador(a): Prof.(a). Dra. Larissa Magalhães Alvarenga

Coorientador(a): Bianca Prado Costa

CURITIBA

2024

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Larissa, Bianca e Alessandra, pela oportunidade, por todo o conhecimento e cuidado durante o desenvolvimento deste trabalho e da minha formação.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Imunoquímica, Ana, Beatriz, Celina, Giovana, Giulia, professora Juliana, Larissa, Mariana e Michele, pelo companheirismo.

À minha mãe Maria Luiza, minha irmã Gisele e meu pai Ozeno, por todo o amor, apoio incondicional e paciência. Às minhas amigas, Dari, Mari e Mi, por todo o incentivo e pelos momentos de distração ao longo dessa jornada.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“We may encounter many defeats, but we must not be defeated. It may even be necessary to encounter defeat, so that we can know who we are .”

– Maya Angelou

RESUMO

A ceratite amebiana corresponde a infecção causada por *Acanthamoeba spp.*, gênero de protozoários de vida livre encontrados de maneira ubíqua e que possuem dois estágios em seu ciclo de vida: trofozoítos, forma metabolicamente ativa, e cistos, forma de resistência. Essa infecção tem como principal fator de risco a má higienização de lentes de contato, ligada a danos na córnea. Diversos elementos estão associados a progressão da infecção, entre eles a resposta do sistema imune do hospedeiro, a qual ainda não está totalmente elucidada. Entre as células relevantes na resposta imune inata, os macrófagos estão particularmente envolvidos e são considerados essenciais para iniciar a resposta imune e para a eliminação dos protozoários através da fagocitose. Visando buscar explicações para como a ocorre a resposta imune mediada por macrófagos frente a trofozoítos de *Acanthamoeba spp.* na presença de um anticorpo monoclonal murino, foram realizados ensaios de padronização de co-cultivo de macrófagos murinos e trofozoítos de *Acanthamoeba spp.*. Para isso diferentes condições foram avaliadas, entre elas proporção (macrófagos:trofozoítos), tempos de incubação, pré-ativação ou não por LPS, assim como a padronização da coloração de May-Grünwald Giemsa para diferenciar os protozoários dos macrófagos. Também foram analisadas alterações no padrão de interação dos macrófagos e trofozoítos na presença ou não de anticorpo monoclonal murino específico. Os resultados obtidos demonstraram que as melhores condições para observar a interação foram: macrófagos e trofozoíto utilizados na proporção 2:1, o tempo de incubação de 4 horas e com pré-ativação com LPS, durante 3 horas, antes de adicionar os trofozoítos. Quanto à coloração diferencial, a diluição do corante de Giemsa na proporção de 1:10 foi capaz de evidenciar as diferenças morfológicas entre as células. Não foi observado fagocitose, mas foi possível visualizar interação entre as células e indícios da ativação de macrófagos na presença dos trofozoítos, a qual é aumentada com a adição do anticorpo monoclonal específico. Entretanto, ainda são necessários outros experimentos para avaliar alterações no metabolismo dos macrófagos, assim como a produção de citocinas na presença do protozoário, que permitam uma melhor elucidção do mecanismo imunológico desencadeado.

Palavras-chave: Trofozoítos, Ceratite amebiana (CA), Macrófagos, Anticorpo monoclonal.

ABSTRACT

Amoebic keratitis is an infection caused by *Acanthamoeba* spp., a genus of free-living protozoa found ubiquitously and which have two stages in their life cycle: trophozoites, the metabolically active form, and cysts, the resistant form. The main risk factor for this infection is poor contact lens hygiene, which is linked to damage to the cornea. Several elements are associated with the progression of the infection, including the response of the host's immune system, which has yet to be fully elucidated. Among the relevant cells in the innate immune response, macrophages are particularly involved and are considered essential for initiating the immune response and eliminating the protozoa through phagocytosis. In order to find explanations for how the macrophage-mediated immune response to *Acanthamoeba* spp. trophozoites occurs in the presence of a murine monoclonal antibody, standardization tests were carried out on the co-cultivation of murine macrophages and *Acanthamoeba* spp. trophozoites. To this end, different conditions were evaluated, including the ratio (macrophages:trophozoites), incubation times, pre-activation or not by LPS, as well as the standardization of the May-Grünwald Giemsa stain to differentiate the protozoa from the macrophages. Changes in the interaction pattern of macrophages and trophozoites in the presence or absence of a specific murine monoclonal antibody were also analyzed. The results showed that the best conditions for observing the interaction were: macrophages and trophozoites used in a 2:1 ratio, incubation time of 4 hours and pre-activation with LPS for 3 hours before adding the trophozoites. As for differential staining, the 1:10 dilution of Giemsa dye was able to highlight the morphological differences between the cells. No phagocytosis was observed, but it was possible to see interaction between the cells and evidence of macrophage activation in the presence of trophozoites, which is increased by the addition of the specific monoclonal antibody. However, further experiments are still needed to assess changes in macrophage metabolism, as well as cytokine production in the presence of the protozoa, which will allow a better elucidation of the immune mechanism triggered.

Keywords: Trophozoites, Amoebic keratitis (AK), Macrophages, Monoclonal antibody.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Morfologia dos estágios de vida do protozoário.....	13
FIGURA 2 – Avaliação da interação entre MΦ:T (2:1) I.....	24
FIGURA 3 - Avaliação da interação entre MΦ:T (2:1) II.....	25
FIGURA 4 - Avaliação da interação entre MΦ:T (2:1) III.....	26
FIGURA 5 - Macrófagos e trofozoítos corados por May-Grunwald Giemsa.....	27
FIGURA 6 - Esquema para a determinação das zonas de interação.....	28
FIGURA 7 - Efeito da adição do anticorpo monoclonal mAb3r I.....	29
FIGURA 8 - Efeito da adição do anticorpo monoclonal mAb3r II.....	30
FIGURA 9 - Efeito da adição do anticorpo monoclonal mAb3r III.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ADCP (*Antibody dependent cell phagocytosis*)
ATCC (*American Type Culture Collection*)
ANEr (Anticorpo Não-Específico recombinante)
CA (Ceratite Amebiana)
CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais)
DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
EAG (Encefalite Amebiana Granulomatosa)
Ig (Imunoglobulina)
IL (Interleucina)
mAb (*monoclonal Antibody*)
MGG (May-Grünwald Giemsa)
MYD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*)
MΦ (Macrófagos)
MΦ:T (Macrófagos:Trofozoito)
PBS (*Phosphate-Buffered Saline*)
PCR (*Polymerase Chain Reaction*)
PYG (peptona, extrato de levedura, glicose)
RI (Resposta Imune)
RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)
TLR4 (*Toll-like receptor 4*)
UFPR (Universidade Federal do Paraná)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Protozoários do gênero <i>Acanthamoeba</i> spp.....	12
2.2. Ceratite amebiana: patogenia, diagnóstico e tratamento.....	13
2.3. Resposta imune contra ceratite amebiana.....	15
2.4. Atuação dos macrófagos.....	16
2.5. Anticorpos monoclonais.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. OBJETIVO GERAL.....	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Isolados de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	20
4.2. Cultivo de macrófagos.....	20
4.2.1. Extração de macrófagos peritoniais.....	20
4.2.2. Cultivo de macrófagos RAW 264.7.....	21
4.3. Ensaios de interação/co-cultivo.....	21
4.4. Coloração de May-Grunwald Giemsa.....	22
4.5. Ensaios de interação/co-cultivo na presença do anticorpo específico.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1. Avaliação da ativação de macrófagos.....	24
5.2. Avaliação da ativação de macrófagos na presença do anticorpo específico.....	28
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
7. REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os protozoários ameboides de vida livre do gênero *Acanthamoeba* spp. são encontrados no meio ambiente em 2 formas: trofozoítos, sua forma metabolicamente ativa, e cistos, forma de resistência do protozoário. O gênero *Acanthamoeba* inclui 23 genótipos diferentes que podem ou não ser patogênicos. Estas amebas de vida livre são capazes de causar infecções graves em diferentes locais, inclusive em regiões imunologicamente privilegiadas, como sistema nervoso central e olho, causando encefalite amebiana granulomatosa e ceratite amebiana, respectivamente (Rayamajhee, et al, 2022). A ceratite amebiana corresponde a maioria das infecções causadas por trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. e está fortemente associada ao manejo incorreto de lentes de contato e danos na córnea. O diagnóstico correto desta infecção, seguido de tratamento eficaz, impede que a doença se agrave e leve à perda da visão.

Quanto ao papel do sistema imunológico frente a ceratite amebiana, este não está totalmente elucidado. Sabe-se que tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa ocorrem (Niederhorn, 2021), porém como elas se interconectam e a função dos diferentes tipos celulares, especialmente na resposta imune inata, ainda necessitam ser esclarecidos. Entre as células relevantes na resposta imune inata, os fagócitos possuem um papel crucial ao longo de toda a infecção e, dependendo de como atuam, podem levar a resolução ou a piora do quadro.

Dentre os fagócitos, macrófagos estão particularmente envolvidos no reconhecimento do protozoário e são considerados essenciais ao longo de toda a resposta imune (Hurt, et al, 2001), entretanto a maneira como o protozoário consegue ativar essa resposta imune mediada por macrófagos ainda não está totalmente esclarecida, assim como não se sabe quais os possíveis efeitos causados pela adição do anticorpo monoclonal mAb3, previamente produzido e caracterizado para a detecção do protozoário (Becker-Finco, et. al 2013, Weber-Lima et. al 2020).

Visando buscar explicações para como a resposta imune mediada por macrófagos ocorre e qual a possível interferência da adição de um anticorpo monoclonal murino nesta resposta, o objetivo deste trabalho, a partir da padronização de ensaios de co-cultivo *in vitro*, foi avaliar a interação entre macrófagos murinos na presença de protozoários do gênero *Acanthamoeba* spp.,

sob influência ou não do anticorpo monoclonal, considerando principalmente a capacidade de anticorpos de ativar o sistema imune, particularmente pela opsonização e recrutamento de células do sistema imune inato.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Protozoários do gênero *Acanthamoeba* spp.

Diferentes espécies de *Acanthamoeba* spp. compõem um gênero de protozoários de vida livre, que são encontrados no meio ambiente de forma ubíqua. Tais protozoários possuem dois estágios em seu ciclo de vida (Figura 1), se apresentando como trofozoítos, forma metabolicamente ativa e infectiva, caracterizada pela presença de vacúolos no citoplasma e projeções de membrana chamadas acantapódios (Fig 1A), ou como cistos, forma de resistência do protozoário, que possui formato circular e uma parede dupla (Fig 1B). Neste gênero, são incluídos pelo menos 23 diferentes genótipos, que podem ou não ser patogênicos para o ser humano e, entre os patogênicos, algumas espécies pertencentes ao genótipo T4 são responsáveis por causar infecções graves (Rayamajhee, et al, 2022). Entre as infecções causadas por trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. as que ocorrem em locais onde a resposta imune inflamatória não ocorre de maneira clássica, denominados de sítios privilegiados imunologicamente, como sistema nervoso central e olho, podem levar, respectivamente, a quadros como encefalite amebiana granulomatosa (EAG) e ceratite amebiana (CA) e, mesmo estando atreladas a indivíduos imunocomprometidos (EAG) ou ao uso de lentes de contato (CA), ainda são patologias graves que podem levar a perda da visão ou até mesmo a óbito.

FIGURA 1 - Morfologia dos estágios de vida do protozoário

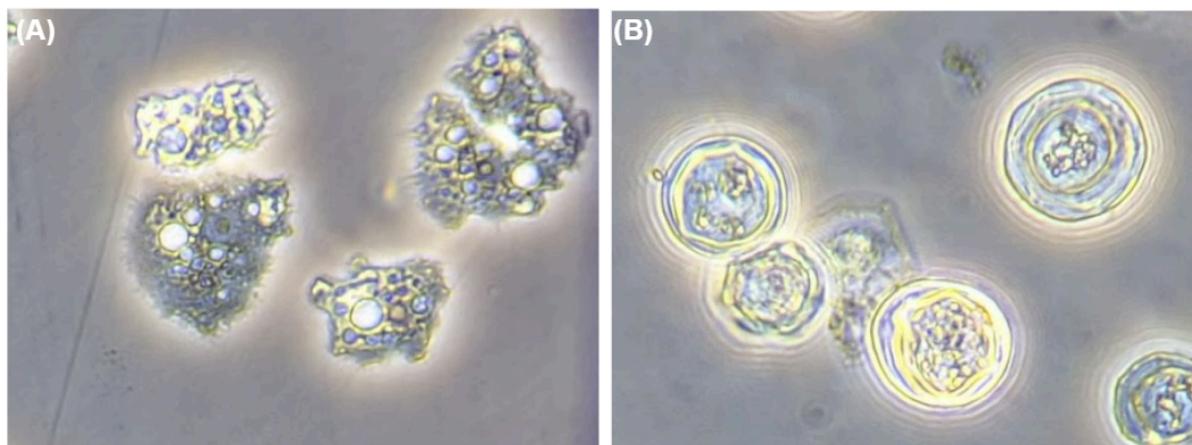


FIGURA 1. Morfologia dos estágios de vida do protozoário. Trofozoítos (A) e cistos (B) de *Acanthamoeba* spp. Imagens obtidas em microscópio invertido em contraste de fase. Aumento de 400x. Fonte: A autora (2024).

2.2. Ceratite amebiana: patogenia, diagnóstico e tratamento

A ceratite amebiana (CA) representa a maioria das infecções causadas por trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., ocasionada por pelo menos 8 genótipos diferentes, onde o genótipo T4 é o maior responsável pelas infecções. Esta infecção acomete principalmente usuários de lentes de contato, sendo que o manejo incorreto destas é o principal fator de risco para o estabelecimento da infecção. Os sinais clínicos clássicos da infecção são a formação de diferentes infiltrados na córnea do paciente e os sintomas incluem dor ocular, vermelhidão e irritação (Fanselow, 2021).

O processo patológico da ceratite se inicia quando trofozoítos se aderem à córnea, este é mediado principalmente através de proteínas ligadoras de manose, as quais entram em contato com glicoproteínas manosiladas presentes no epitélio da córnea. Ao se ligarem às glicoproteínas, os trofozoítos destroem as células epiteliais, através de mecanismos como fagocitose, indução de apoptose e lise celular. Subsequentemente, ocorre a invasão ao estroma, na qual metabólitos como metaloproteínases e serinoproteínases produzidos pelas amebas degradam a membrana basal do epitélio e invadem o estroma. Uma vez que a invasão ocorra, destroem os ceratócitos, o que provoca uma intensa resposta inflamatória e necrose, neste ponto, caso o diagnóstico e o tratamento não ocorram de maneira correta, a infecção pode levar a perda da visão. Em certos casos, muitas vezes

devido à resposta imune do hospedeiro, os trofozoítos acabam se diferenciando em cistos, o que leva a infecção ao seu estado de latência (Fanselow, 2021). Classicamente, a infecção não se torna intraocular (Clarke et. al. 2005), porém em certos casos mais graves, que envolvem complicações devido a resposta inflamatória crônica, a qual inclui infiltrados leucocitários e formação de granulomas, a doença pode se tornar intraocular (Prado-Costa, et. al. 2025).

Para que a escolha do tratamento seja assertiva, é essencial que o diagnóstico preciso seja feito, especialmente nos estágios iniciais, quando a infecção ainda não causou danos severos ao paciente. Diferentes metodologias são utilizadas para o diagnóstico, como PCR e microscopia confocal, entretanto o padrão ouro para o diagnóstico é o raspado de córnea seguido de cultura da amostra obtida, mas este método ainda tem suas limitações, como baixa sensibilidade e demora até a entrega dos resultados da cultura (Fanselow, 2021). Visando melhorias para o diagnóstico, alguns grupos avaliaram a utilização de anticorpos monoclonais em testes *in vitro* para detecção do protozoário. Os resultados obtidos pelo grupo confirmaram a especificidade do mab3 para trofozoítos de *Acanthamoebas*, de diferentes isolados, indicando um cenário promissor para o emprego de imunoglobulinas específicas no diagnóstico da CA (Weber-Lima, et al, 2020).

No que concerne o tratamento, este envolve diferentes medicamentos, que são capazes de eliminar tanto trofozoítos como cistos, porém são necessárias associações para a eliminação efetiva dos cistos, uma vez que estes são altamente resistentes às estratégias medicamentosas empregadas na atualidade. As biguanidas são utilizadas para eliminar tanto trofozoítos como cistos e são comumente associadas à diamidinas aromáticas, mas apresentam altas taxas de toxicidade. Para a eliminação de trofozoítos, são utilizados antibióticos de amplo espectro, como a neomicina, os quais também podem ser associados para a eliminação eficaz do protozoário. Também são utilizados corticoides para redução da inflamação causada, entretanto seu uso antes do diagnóstico correto e terapia específica é controverso, dificultando a atuação dos medicamentos utilizados para a eliminação do parasita *em si*. Quando a intervenção medicamentosa não é eficaz e a infecção entra em seu estágio avançado, o transplante de córnea se torna o último recurso para o paciente (Fanselow, 2021).

2.3. Resposta imune contra ceratite amebiana

O tipo de resposta imune (RI) desencadeada no hospedeiro após o início da infecção é crucial e pode acarretar em vários desfechos, sendo que um dos principais é a cura, que está fortemente associada ao diagnóstico correto e antecipado, tratamento adequado e uma resposta imune inicial eficaz, mediada principalmente por células fagocitárias, que reconhecem e eliminam os protozoários, seguido de uma resposta adaptativa controlada, na qual linfócitos e imunoglobulinas estão envolvidas. Já em cenários nos quais ocorre a piora do quadro, outros fatores estão associados a este desfecho, como reconhecimento inadequado do patógeno e resposta imune inicial desregulada o que acarreta na persistência do patógeno, uma resposta imune tardia e descontrolada que pode levar a inflamação crônica e complicações extracorneais. Além dos fatores do próprio sistema imune do hospedeiro, motivos como polimorfismos genéticos, diagnóstico e tratamento incorretos, eliminação inservível do protozoário e cepas resistentes são algumas das causas intimamente relacionados a quadros de CA piores, os quais aumentaram nos últimos anos (Prado-Costa, et. al. 2025).

Componentes da RI inata, especialmente neutrófilos e macrófagos, são críticos para o reconhecimento do protozoário, que ocorre majoritariamente pelos receptores *Toll-like* do tipo 4 (TLR4) e ativa a via MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*), levando a produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8 e IL-12. Esses fagócitos também são essenciais para a eliminação dos trofozoítos e controle da infecção ao longo de todo o processo da doença. Estas células atuam de modos distintos frente ao protozoário, sendo que os neutrófilos são responsáveis pela eliminação do protozoário através da produção de espécies reativas de oxigênio, enquanto macrófagos dependem do processo de fagocitose (Hurt, et. al. 2001). Entretanto, nem todos os elementos da RI inata estão bem definidos, o que traz a necessidade caracterizar outros meios pelos quais estas células atuam combatendo a infecção e eliminando as amebas, como a avaliação da produção de metabólitos, tais quais espécies reativas de oxigênio, produção de óxido nítrico, assim como mediadores que modulam a RI.

Já a resposta imune adaptativa, responsável por controlar a infecção em estágios mais avançados, é composta por linfócitos Th1, Th2 e Th17, sendo que linfócitos Th17 possuem um papel crucial no controle da CA, através da produção de citocinas como IL-17 A, IL-22 e IL-1 β (Suryawanshi, et. al, 2015, Carnt, et. al, 2021). Porém, tais achados surgiram a partir de um pequeno número de estudos conduzidos em animais, o que não é suficiente para desvendar completamente quais são as células e as citocinas envolvidas. A presença de imunoglobulinas, em especial da classe IgA, é crucial para a proteção da mucosa ocular no estágio inicial da infecção. Estudos em modelos animais demonstraram que a imunização com antígenos de *Acanthamoeba*, na presença de um adjuvante de mucosa, leva a produção de IgA e que a presença desses anticorpos anti-*Acanthamoeba* impedem que trofozoítos se liguem ao epitélio da córnea, porém isso só é observado se a imunização ocorre antes da exposição ao protozoário (Leher, et, al, 1999). Além disso, Feng et. al. (2007) demonstraram que a presença de IgA no estroma do epitélio da córnea ameniza a infecção, isso pode ser explicado devido a capacidade dos anticorpos de recrutar neutrófilos e ativar o sistema complemento, os quais são relevantes para a eliminação dos trofozoítos. Também é evidenciado que indivíduos sem histórico de ceratite amebiana possuem anticorpos das classes IgG e IgA anti-*Acanthamoeba*, porém, em indivíduos com a infecção ativa, a presença de anticorpos da classe IgG é alta quando comparada aos sem histórico, enquanto o título de anticorpos da classe IgA diminui (Alizadeh, et al, 2001).

2.4. Atuação dos macrófagos

Os macrófagos são fagócitos que desempenham um importante papel para a resolução e controle do quadro de ceratite causado por trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., especialmente nos estágios iniciais, pois a depleção destes macrófagos levam a uma piora do quadro e, *in vitro*, macrófagos são capazes de eliminar trofozoítos (Nieder Korn, 2021). Cano, et al. (2017), demonstraram que o protozoário consegue ativar macrófagos através de receptores *Toll-like* do tipo 4 (TLR4), o que ativa a via MyD88, levando sinais que induzem a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Este mesmo grupo também demonstrou o perfil de citocinas expressas por macrófagos humanos na presença de trofozoítos, o

qual inclui diferentes citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, as quais são essenciais para promover uma melhora na resposta imune local e eventual eliminação dos protozoários (Mattana, et al, 2016). Os macrófagos também podem ser ativados pelo mecanismo chamado de fagocitose celular dependente de anticorpo (do inglês, *antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP), o qual envolve principalmente a presença de anticorpos da classe IgG ou IgA que serão responsáveis por opsonizar patógenos. A opsonização ocorre quando os anticorpos se ligam aos patógenos através da porção Fab, facilitando a fagocitose, pois, como a porção Fc dos anticorpos estará livre, ocorrerá a interação dessa porção com os receptores Fc presentes em macrófagos, esta interação macrófago-anticorpo fará com que o patógeno seja mais facilmente reconhecido pelo macrófago e, subsequentemente, fagocitado e destruído (Laassili et. al. 2023). Ainda faltam caracterizações importantes sobre como o metabolismo dos macrófagos é alterado pela presença do protozoário.

2.5. Anticorpos monoclonais

Atualmente, anticorpos monoclonais (mAbs) representam a classe de medicamentos que mais cresce. Devido sua altíssima especificidade, são amplamente utilizados para o tratamento de doenças autoimunes e diferentes tipos de cânceres, sendo que grande parte dos anticorpos monoclonais aprovados são voltados para doenças crônicas. Poucos são os anticorpos monoclonais aprovados para o tratamento de doenças infecciosas e os que estão em uso são voltados para o tratamento de infecções virais (Castelli, et al, 2019).

Trabalhos mais recentes que caracterizam a atuação de anticorpos monoclonais frente a *Acanthamoeba* spp. são voltados para identificar e localizar o protozoário (Kang, et al, 2018) e para possível melhora no diagnóstico (Weber-Lima et. al 2020), neste caso, o anticorpo monoclonal mAb3 de origem murina vem sendo estudado como candidato pelo grupo. Trabalhos que observam a interação entre macrófagos e trofozoítos na presença de anticorpos e alterações neste parâmetro já foram feitos com anticorpos policlonais (Wang. et. al 2021, Stewart et. al, 1992). Até o presente momento, não existem relatos sobre a caracterização da atuação de

anticorpos monoclonais na resposta imune inata, especialmente para a atuação de macrófagos, frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliação da ativação de macrófagos frente a *Acanthamoeba* spp., na presença de anticorpo específico (mAb3).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronização das condições de co-cultivo entre trofozoítos e macrófagos;
- Avaliação da interação entre macrófagos e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.;
- Caracterização da interação na presença do anticorpo monoclonal específico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Isolados de *Acanthamoeba* spp.

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 (Rowbothan, 1980). Uma cultura de referência do *American Type Culture Collection* (*Acanthamoeba polyphaga*), aqui denominada AP2 (ATCC # 30461, um isolado clínico de lesão de CA), do genótipo T4 e axenizada em 1973 foi empregada.

4.2. Cultivo de macrófagos

4.2.1. Extração de macrófagos peritoniais

Macrófagos foram extraídos do peritônio de camundongos BALB/c (CEUA/UFPR 1468) adaptando a metodologia descrita por Gonçalves & Mosser (2015). Para obter uma quantidade maior de macrófagos, 600 µL de óleo mineral foram injetados na cavidade peritoneal dos animais, este procedimento foi realizado apenas no primeiro experimento. Decorridos os 4 dias, 5 mL de meio *RPMI* (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (*PenStrep*) foram injetados, após eutanásia, na cavidade peritoneal do camundongo, os mesmos 5 mL foram recuperados, adicionados a um tubo, o qual foi centrifugado e em seguida foi realizada a lavagem do conteúdo coletado da cavidade peritoneal com mais 10 mL de meio *RPMI*, após essa lavagem as células foram contadas e distribuídas em uma placa para cultivo de células de 24 ou de 96 poços com fundo chato em diferentes concentrações de células por poço em diferentes volumes. A placa foi então colocada em uma estufa a 37° C com suplementação de 5% CO₂ durante diferentes tempos antes de ser utilizada nos ensaios.

4.2.2. Cultivo de macrófagos RAW 264.7

Os macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram mantidos em cultivo axênico, em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (*PenStrep*). As garrafas de cultivo foram mantidas a 37°C em atmosferas com 5% de CO₂. As células foram plaqueadas e incubadas durante diferentes tempos antes dos experimentos, nas mesmas condições das garrafas, porém diferentes concentrações foram adicionadas em placas de 96 poços com fundo chato em um volume final de 100 µL por poços.

4.3. Ensaios de interação/co-cultivo

Diversos ensaios foram realizados, visando padronizar as melhores condições para observar a interação entre os dois tipos celulares, variando o tipo de macrófago, tamanho da placa de cultivo, tempo de plaqueamento, manejo das células, proporção entre os tipos celulares e o tempo de interação entre estes (Tabela 1).

TABELA 1 – Ensaios de padronização

Ensaio	Origem dos macrófagos	Placa	Tempo de cultivo de MΦ*	Manejo	Proporções (MΦ:T**)	Tempo de interação
I	Peritoneal	24	48 h	Estimulação	2:1 e 1:1	2 e 4 h
II	Peritoneal	96	24 h	Ativação com LPS	2:1	4 h
III	Raw 264.7	96	24 h	Ativação com LPS	2:1	4 h

*MΦ: macrófagos; **T: trofozoítos.

Nos dois primeiros ensaios (I e II) foram utilizados macrófagos murinos peritoneais recuperados de camundongos BALB/c (um animal por experimento),

sendo que no ensaio I, o lavado peritoneal foi recuperado após estimulação prévia, como descrito no item 4.2. Neste mesmo ensaio, o plaqueamento das células foi realizado em placa de 24 poços, em que 1×10^5 macrófagos foram plaqueados por poço em um volume final de 300 μL , 48 horas antes da adição dos trofozoítos. Utilizando trofozoítos da cepa AP2, duas proporções macrófago:trofozoíto (M Φ :T) foram testadas, 2:1 e 1:1, em que, respectivamente, $0,5 \times 10^5$ e 1×10^5 trofozoítos foram adicionados a placa. Após 2 e 4 horas, foram feitos registros visuais da interação entre os tipos celulares em microscópio óptico.

Diferentes parâmetros foram alterados no ensaios II, em que 2×10^4 macrófagos por poço foram plaqueados em um volume final de 100 μL , 24 horas antes da adição dos trofozoítos em uma placa de 96 poços. A pré-ativação foi realizada com 200 ng/mL de LPS durante 3 horas e 1×10^4 trofozoítos por poço foram adicionados à placa (2:1), seguido dos registros visuais após 4 horas de ensaio.

No ensaio III macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram utilizados. Para tanto, 1×10^4 macrófagos por poço foram plaqueados no volume final de 100 μL , 24 horas antes da adição dos trofozoítos. A ativação ocorreu da mesma maneira que o experimento anterior, $0,5 \times 10^4$ trofozoítos por poço foram acrescentados e após 4 horas foram feitos os registros e a coloração diferencial do ensaio.

Os controles de cada ensaio foram realizados nas mesmas condições dos experimentos e consistiam de poços somente com macrófagos e poços apenas com trofozoítos.

4.4. Coloração de May-Grunwald Giemsa

Para diferenciar a morfologia dos macrófagos murinos dos trofozoítos de *Acanthamoeba* após o ensaio de co-cultivo/interação, foi realizada a coloração de May-Grunwald Giemsa (MGG). Para tanto, o protocolo definido após padronizações realizadas tanto com macrófagos quanto com trofozoíto isolados ou em co-cultivo foi, decorridas as 4 horas de experimento, foi removido o meio dos poços testes e controles, seguido pela fixação das células com 120 μL de metanol 100% por poço durante 5 minutos. Após esse tempo, o metanol foi descartado e, com pipeta pasteur, foram acrescentadas 2 gotas do corante de May-Grunwald, durante 3 minutos, ao fim deste tempo, 2 gotas de PBS [1x] eram acrescentadas em cada poço durante mais 3 minutos, seguido da remoção do conteúdo dos poços e lavagem

com PBS [1x]. Quanto ao corante de Giemsa, este foi testado em diferentes diluições e a escolhida para os ensaios foi a de 1:10 (Giemsa:PBS [1x]). O corante diluído foi acrescentado na mesma quantidade, 2 gotas por poço, durante 10 minutos. Por fim, os poços foram lavados com PBS [1x] e para a avaliação da diferença de morfologia foram tiradas fotos em diferentes aumentos no microscópio óptico.

4.5. Ensaios de interação/co-cultivo na presença do anticorpo específico

As placas para os ensaios de interação na presença do anticorpo foram preparadas de modo similar às condições do protocolo do ensaio III do item 4.3, alterando o tempo de plaqueamento, que passou de 24 para 16 horas. Entretanto, antes de serem adicionados a placa de macrófagos, os trofozoítos foram pré-incubados com o anticorpo mAb3 recombinante (mAb3r) ou com um anticorpo não-específico recombinante (ANEr) nas concentrações de 30, 10, 5 e 2,5 µg/mL, durante 1 hora, sob agitação em uma estufa a 37° C. Após 2 horas de co-cultivo, foram feitos registros visuais de 10 campos por poço em cada réplica. A partir dos registros, a contagem dos tipos celulares foi realizada quando a morfologia dos trofozoítos e dos macrófagos estava clara.

4.6. Análise estatística

A partir dos dados obtidos, as análises estatísticas foram conduzidas utilizando do *software GraphPad Prism 8.0.1*, o teste de ANOVA de uma via foi aplicado, sendo que valor de *p* inferior a 0,05 foi classificado como significativo estatisticamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da ativação de macrófagos

Visando compreender melhor a interação entre macrófagos e trofozoítos, foram realizados vários ensaios para a padronização de co-cultivo destes dois tipos celulares, todos estes ensaios demonstraram pontos importantes para adequar o co-cultivo e observar parâmetros que indicam a ativação de macrófagos na presença dos trofozoítos.

Os resultados do ensaio I (Figura 2), na condição de 2:1 após 2 horas de interação, demonstraram alteração na conformação inicial dos macrófagos na presença dos trofozoítos (Figura 2 B), em que é possível observar modificações na organização dos macrófagos no poço, o que não ocorre em (Figura 2 A), controle de macrófagos. Já no tempo de 4 horas (Figura 2 C), não é possível observar claramente a diferença entre a morfologia dos dois tipos celulares. Esta distinção entre macrófagos e trofozoítos já não era tão explícita no tempo avaliado anteriormente. Este ensaio piloto foi extremamente importante para dar continuidade a padronização, visto que a movimentação dos macrófagos observada na presença do protozoário é uma evidência de ativação, uma vez que esse movimento demonstra um rearranjo do citoesqueleto dos macrófagos (Kawakatsu, et. al. 2019).

FIGURA 2 – Avaliação da interação entre MΦ:T (2:1) I

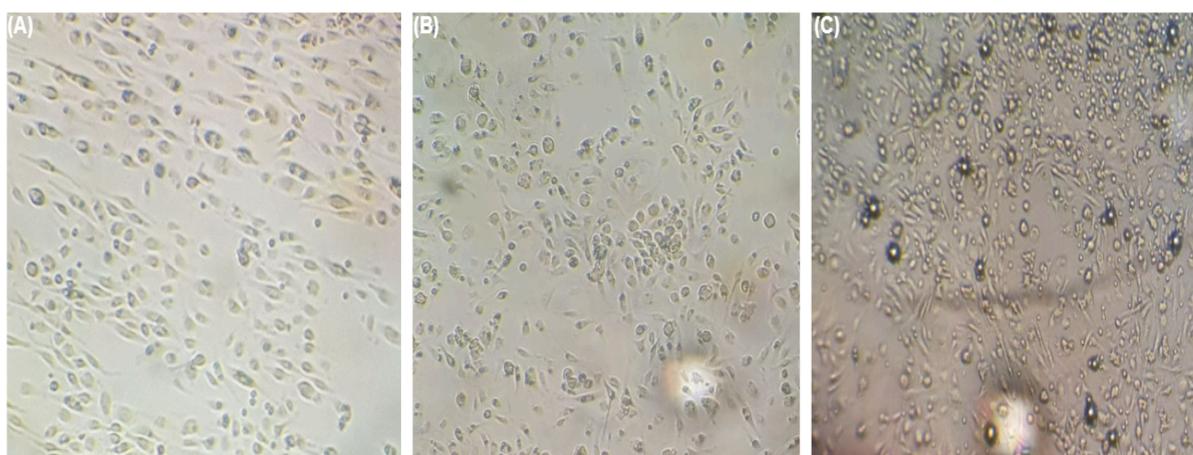


FIGURA 2. Avaliação da interação entre MΦ:T (2:1) I. Monocultura de macrófagos (A), interação MΦ:T no tempo de 2 horas (B) e 4 horas (C). Imagens obtidas em microscópio invertido. Fonte: A autora (2024).

A proporção 2:1 foi escolhida para os ensaios seguintes de padronização, pois a densidade de células é adequada para a visualização da interação. Entretanto, outros pontos importantes para os experimentos seguintes surgiram, como a necessidade da pré-estimulação, o tempo de plaqueamento, o tamanho da placa, tempos de interação entre os tipos celulares e quais seriam as melhores regiões do poço para observar a interação.

No ensaio II (Figura 3), várias alterações foram feitas, a placa utilizada passou a ser de 96 poços, foi testada a pré-ativação dos macrófagos com LPS e a proporção (2:1) e um tempo (4 horas) foram avaliados. Também foi observada a movimentação e, provavelmente devido ao tamanho do poço e menor quantidade de células, é possível observar (Fig 3 C) o contato entre os dois tipos celulares.

FIGURA 3 - Avaliação da interação entre MΦ:T (2:1) II

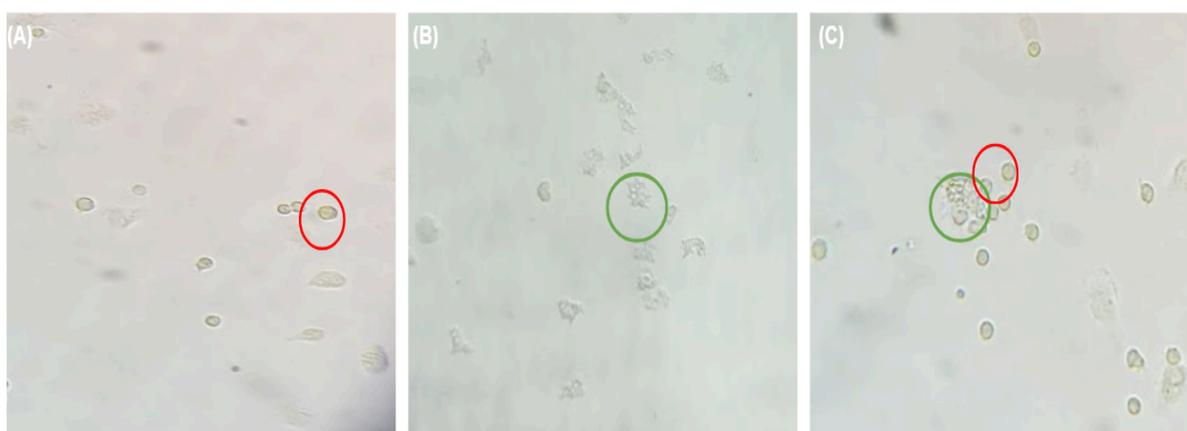


FIGURA 3. Avaliação da interação entre MΦ:T (2:1) II. Monocultura de macrófagos, círculo vermelho indica um macrófago (A), monocultura de trofozoítos, círculo verde indica um trofozoíto (B) e interação MΦ:T no tempo de 4 horas (C). Imagens obtidas em microscópio invertido. Fonte: A autora (2024).

Algumas dúvidas surgiram quanto à morfologia dos tipos celulares analisando a placa e os registros, sendo que a diferenciação quanto a morfologia fica um pouco mais clara ao comparar com os controles, nos quais os trofozoítos (Fig 3 B) apresentam vacúolos em seu citoplasma, além de projeções de membrana características de *Acanthamoeba* (acantopódios) e morfologia ameboide. Também é possível observar as alterações morfológicas dos macrófagos, ao comparar com o experimento anterior, sendo que estes se encontram mais arredondados, como observado nas Figuras 3A e 3C. Algumas teorias podem explicar essa alteração, como o menor tempo de plaqueamento (24h) e a pré-ativação com LPS, como

demonstrado por Schütze et. al (2014) em experimentos com macrófagos murinos, também é relatada a alteração da morfologia após ativação com LPS. Porém, classicamente, quando ativados com LPS, macrófagos tendem a adotar o fenótipo clássico de espraiamento (Wang, et. al, 2014) indicando que concentração e/ou tempo para ativação devem ser ajustados para evitar que os macrófagos tornem-se circulares.

O experimento III (Figura 4), realizado com macrófagos Raw 264.7, tornou mais fácil a distinção entre macrófagos e trofozoítos, assim como evidenciou a existência de interação entre os tipos celulares, no qual observa-se o contato (Fig 4C - setas pretas).

FIGURA 4 - Avaliação da interação entre MΦ:T (2:1) III

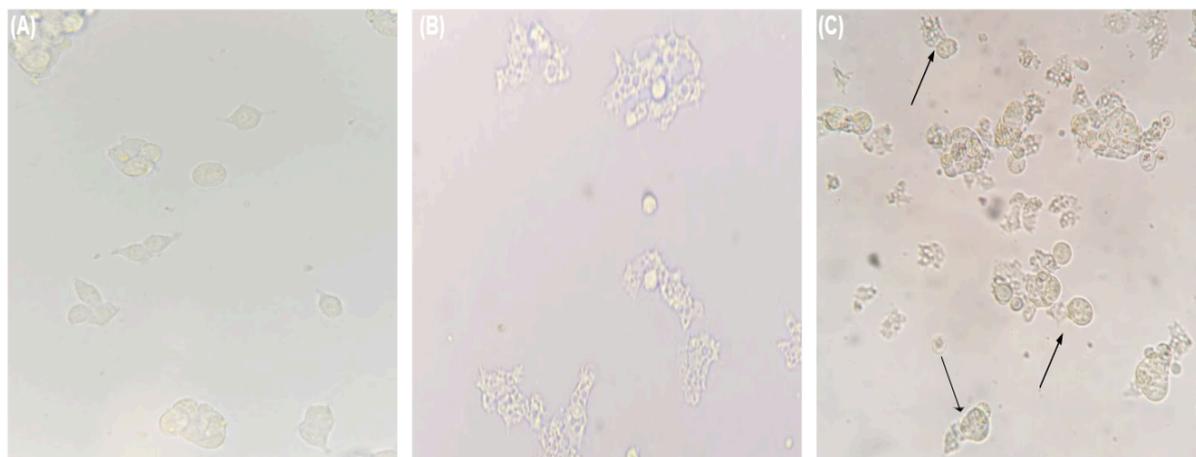


FIGURA 4. Avaliação da interação entre MΦ:T (2:1) III. Monocultura de macrófagos (A), monocultura de trofozoítos (B) e interação MΦ:T no tempo de 4 horas (C), setas pretas indicam contato entre trofozoítos e macrófagos. Imagens obtidas em microscópio invertido. Fonte: A autora (2024).

No ensaio III e em experimentos posteriores, seguindo o mesmo protocolo, foi novamente constatada a movimentação dos macrófagos e o contato com os trofozoítos. Em ensaios de interação semelhantes, Wang et. al. (2021) comentam a existência de fagocitose em tempos menores, o que não foi observado no presente trabalho.

Após feitos os registros, a coloração de MGG foi realizada conforme o item 4.5 (Figura 5). Os macrófagos, coram em um tom roxo escuro e suas estruturas internas, como o núcleo e a membrana das células, tornam-se visíveis (Fig 5A e 5C). O mesmo é constatado para os trofozoítos, onde é possível visualizar os vacúolos presentes no citoplasma do protozoário (Fig 5B e 5C).

FIGURA 5 - Macrófagos e trofozoítos corados por May-Grunwald Giemsa

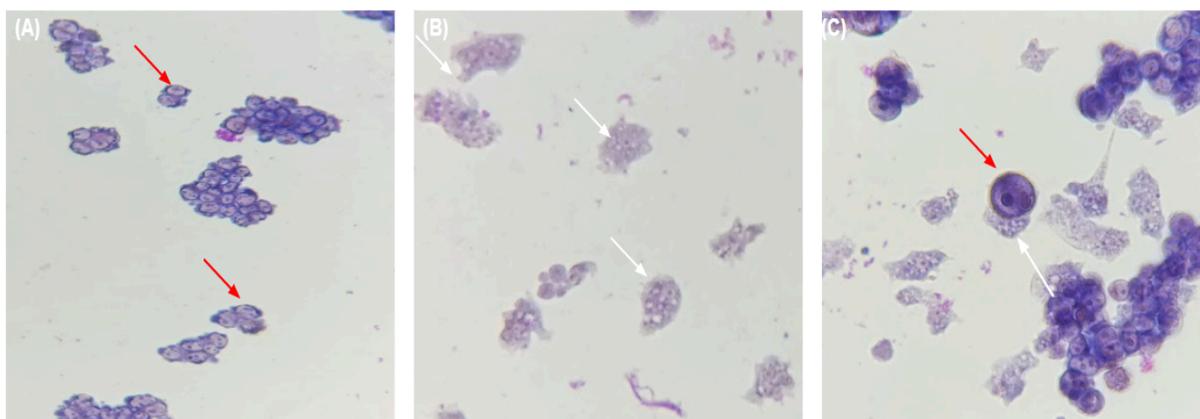


Figura 5. Macrófagos e trofozoítos corados por May-Grunwald Giemsa. Monocultura de macrófagos, (A) setas vermelhas indicam macrófagos, monocultura de trofozoítos (B) setas brancas indicam trofozoítos e interação de MΦ:T no tempo de 4 horas (C). Aumento 400x. Fonte: a autora, 2024.

A formação de “cachos” de macrófagos pode ser explicada devido ao longo tempo que as células foram plaqueadas antes de serem utilizadas nos experimentos (Fig 5A e 5C). Isto indica que plaquear os macrófagos em um tempo menor antes da adição dos trofozoítos pode ser um ajuste necessário para impedir a formação destas estruturas, o que tornaria a observação da interação entre os macrófagos e o protozoários mais perceptível.

A troca de macrófagos peritoneais por macrófagos de linhagem RAW 264.7 ocorreu devido a diversos fatores, como o fato de que células de linhagem possuem uma maior homogeneidade em sua população celular, as condições de cultivo são padronizadas, elimina a necessidade de isolar células primárias de animais em todos os experimentos e, como consequência, reduzir e substituir o uso de animais de pesquisa, seguindo os princípios de Russell-Burch (1959), conhecido como o princípio dos 3 R's.

Neste experimento, também foi observado uma tendência dos macrófagos de se dirigirem à borda dos poços, enquanto os trofozoítos se distribuem na porção central, conforme a ilustração (Figura 6). Essa característica de “marginação” dos macrófagos foi observada em todos os experimentos realizados com macrófagos da linhagem Raw 264.7.

FIGURA 6 - Esquema para a determinação das zonas de interação

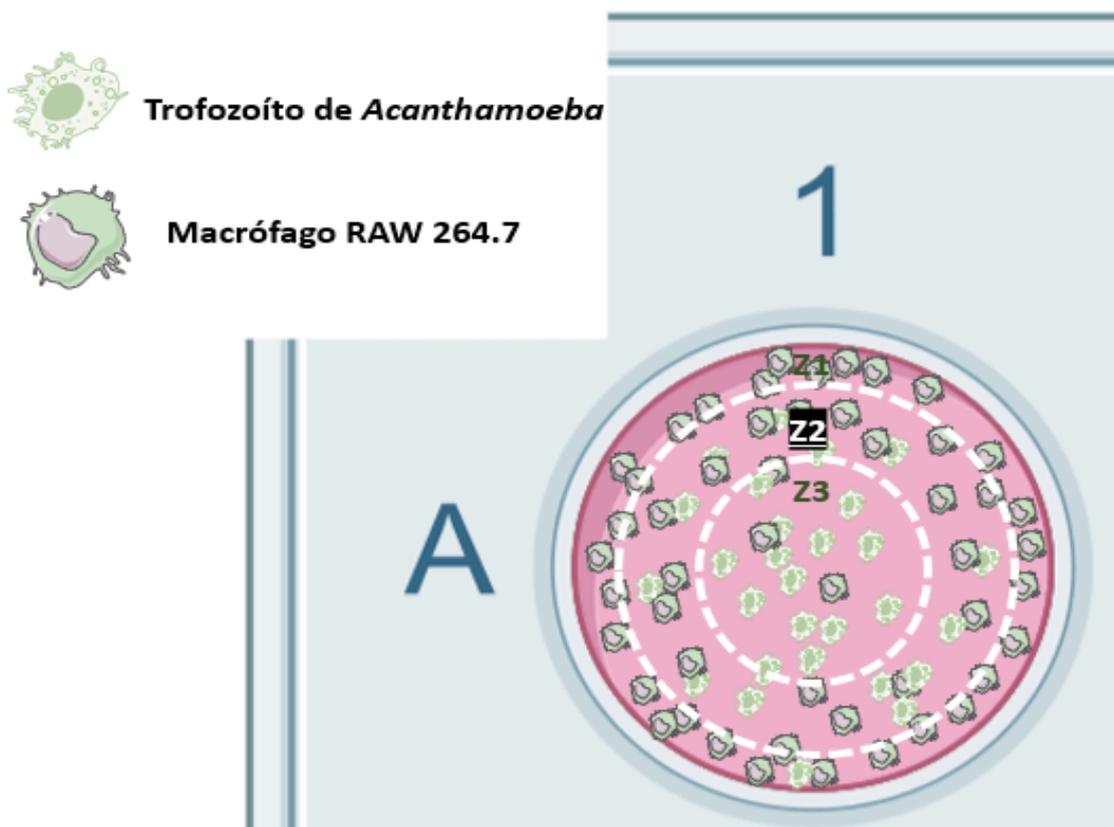


FIGURA 6. Esquema para a determinação das zonas de interação. Z1: zona de macrófagos; Z2: zona intermediária; Z3: zona de trofozoítos. Fonte: A autora (2024).

Devido a esta tendência dos tipos celulares, e pensando em métodos para quantificar se a interação entre os macrófagos e trofozoítos é alterada na presença do anticorpo, foram delimitadas 3 zonas no poço para o registro. Na porção que corresponde a zona 1 (Z1) é possível observar uma concentração de macrófagos, na zona 2 (Z2) existe uma homogeneidade entre os dois tipos celulares, essa foi a zona escolhida para registrar o contato entre macrófagos e trofozoítos. Já na zona 3 (Z3) há um predomínio de trofozoítos.

5.2. Avaliação da ativação de macrófagos na presença do anticorpo específico

Os registros obtidos conforme o item 4.5 foram utilizados para quantificar o contato entre os macrófagos e os trofozoítos. É relevante ressaltar que esta etapa ainda está em padronização.

Dados obtidos a partir do primeiro experimento (Figura 7) indicam que, na presença de 30 $\mu\text{g/mL}$ de mAb3r, há um aumento do contato entre os dois tipos celulares.

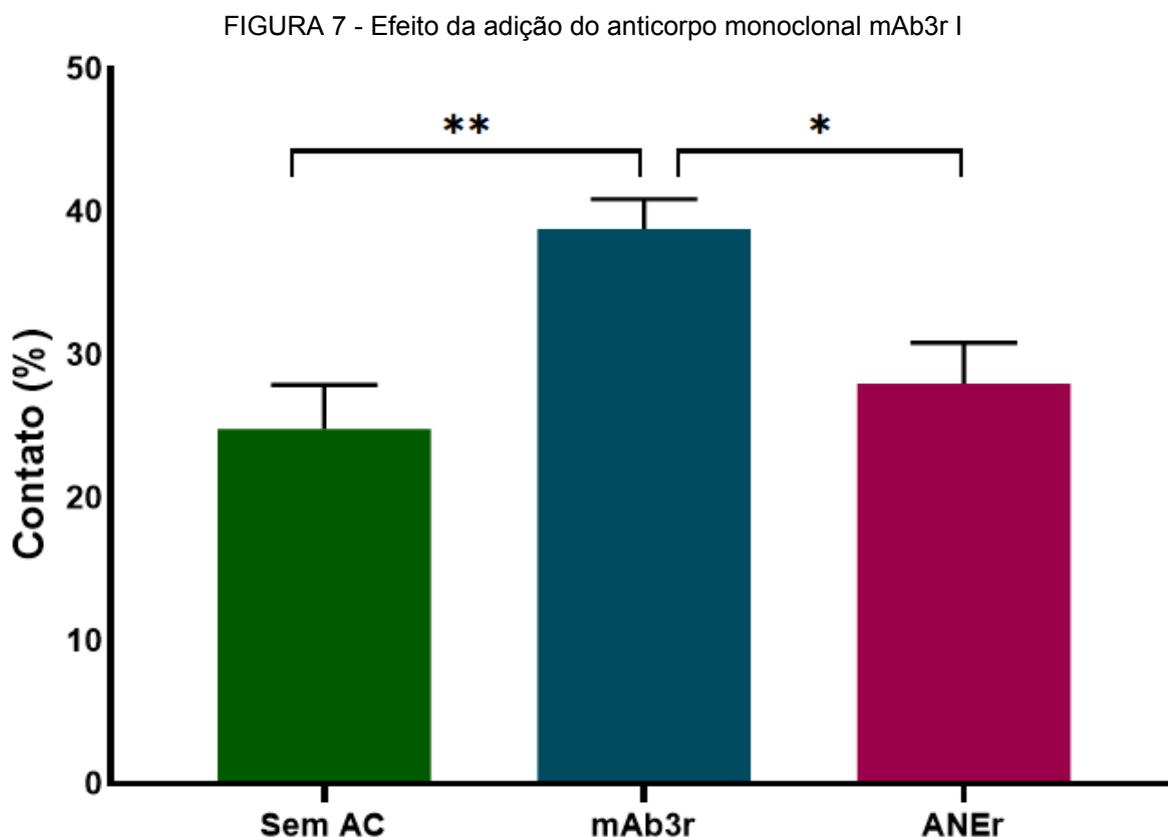


FIGURA 7. Efeito da adição do anticorpo monoclonal mAb3r II. Concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ de mAb3r. n=10 campos; ** = $p < 0.001$, * = $p < 0.05$. Fonte: A autora (2024).

Foi observado um aumento na porcentagem de trofozoítos em contato com macrófagos no grupo tratado com mAb3r quando comparado aos grupos controles e ao tratado com ANEr.

Esta é a primeira evidência de aumento da interação entre macrófagos e trofozoítos na presença de um anticorpo monoclonal. Autores comentam sobre o aumento de fagocitose, onde macrófagos fagocitam um número maior de trofozoítos, na presença de anticorpos policlonais (Wang. et. al 2021, Stewart et. al, 1992).

Em um segundo experimento, concentrações menores testadas demonstram a manutenção desse aumento (Figura 8).

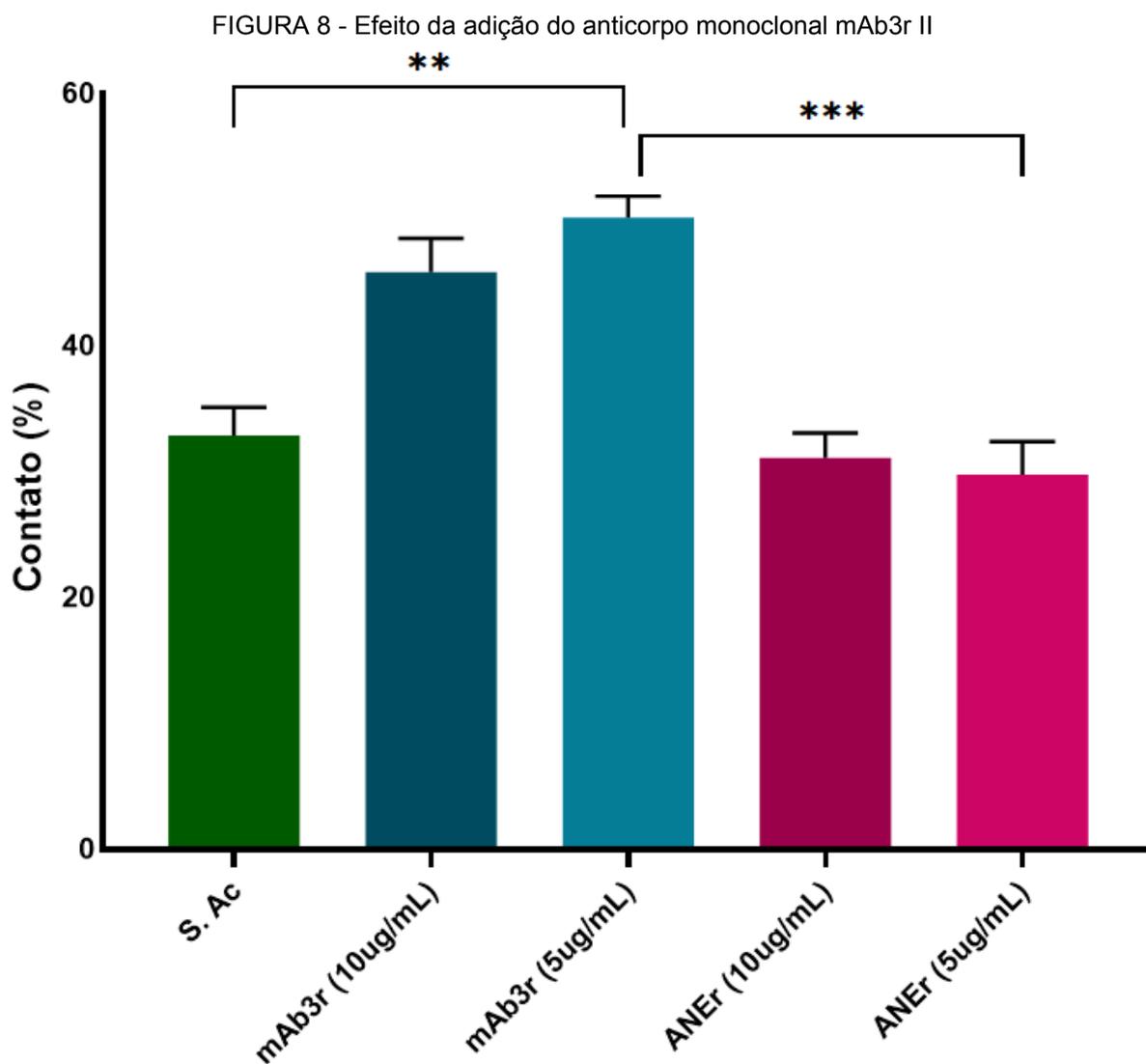


FIGURA 8. Efeito da adição do anticorpo monoclonal mAb3r II. Concentrações testadas de 10 e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mAb3r. $n = 20$ campos. ***= $p < 0.0001$, ** = $p < 0.001$. Fonte: A autora (2024).

Ademais, nota-se que concentrações menores de anticorpo também levam ao aumento do contato quando comparadas aos controles.

Entretanto, em um ensaio seguinte (Figura 9), onde foram testadas menores concentrações, a manutenção do aumento do contato ocorre apenas até $5\mu\text{g}/\text{mL}$.

FIGURA 9 - Efeito da adição do anticorpo monoclonal mAb3r III

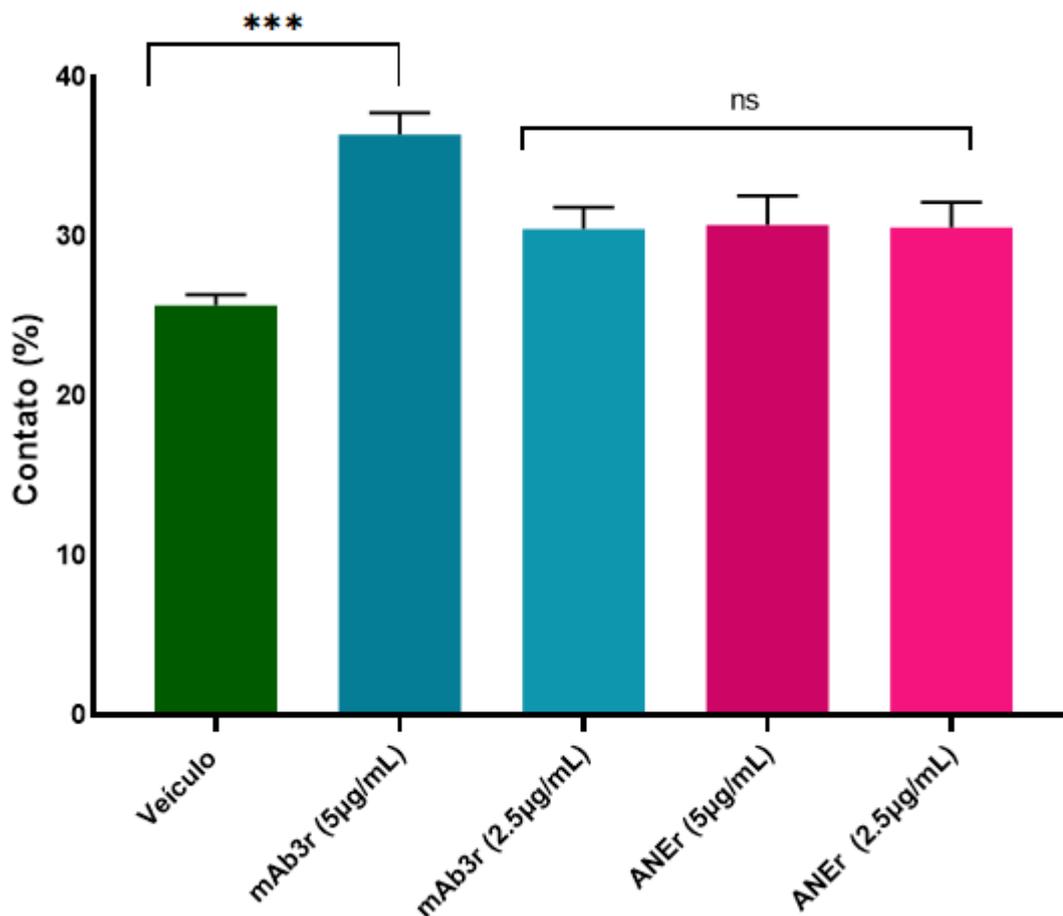


FIGURA 9. Efeito da adição do anticorpo monoclonal mAb3r III. Concentrações testadas de 5 e 2,5 µg/mL de mAb3r. n = 30 campos. ***= $p < 0.0001$, ** = $p < 0.001$, ns = $p > 0,05$. Fonte: A autora (2024).

Neste experimento, foi verificada a ausência de diferença significativa entre o anticorpo mAb3 e o não-específico. Essa discordância entre os resultados demonstram a necessidade de ajustes na concentração de anticorpo utilizada ou ainda uma limitação da metodologia adotada até o momento para quantificar o contato, o que ressalta a necessidade de uma abordagem diferente e mais acurada para quantificar o contato/interação entre os macrófagos e os trofozoítos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao aumento de casos de ceratite amebiana, em especial os com desfechos ruins, é necessário investigar os componentes envolvidos na resposta imune inicial. A resposta mediada por células fagocitárias, como macrófagos, é crucial para o reconhecimento e eliminação do protozoário uma vez que a infecção se estabeleça no hospedeiro, assim observar o comportamento destas células na presença ou não do anticorpo específico previamente caracterizado, auxilia nessa investigação.

Neste contexto, o presente trabalho demonstra que, nas condições padronizadas, é possível observar interação, a qual ocorre na forma de contato, entre os macrófagos e trofozoítos. Além de que, este contato é aumentado na presença de diferentes concentrações do anticorpo monoclonal. Todavia, são necessárias abordagens distintas e mais acuradas para melhor quantificar essa interação.

Além disso, ainda são necessários experimentos adicionais para caracterizar outros parâmetros desencadeados nos macrófagos na presença do protozoário, como a alteração no metabolismo e a produção de citocinas.

7. REFERÊNCIAS

- Alizadeh, H., Apte, S., El-Agha, M. S., Li, L., Hurt, M., Howard, K., Cavanagh, H. D., McCulley, J. P., & Niederkorn, J. Y. Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea**, 20(6), 622–627, 2001.
- 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**, 140(3), 396–405, 2013.
- Cano, A., Mattana, A., Woods, S., Henriquez, F. L., Alexander, J., & Roberts, C. W. *Acanthamoeba* Activates Macrophages Predominantly through Toll-Like Receptor 4- and MyD88-Dependent Mechanisms To Induce Interleukin-12 (IL-12) and IL-6. **Infection and immunity**, 85(6), e01054-16, 2017.
- Carnt, N., Montanez, V. M., Galatowicz, G., Veli, N., & Calder, V. Tear Cytokine Levels in Contact Lens Wearers With *Acanthamoeba* Keratitis. **Cornea**, 36(7), 791–798 2017.
- Castelli, M. S., McGonigle, P., & Hornby, P. J. (2019). The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. **Pharmacology research & perspectives**, 7(6), e00535, 2019.
- Clarke, D. W., Alizadeh, H., & Niederkorn, J. Y. Failure of *Acanthamoeba castellanii* to produce intraocular infections. **Investigative ophthalmology & visual science**, 46(7), 2472–2478 2005.
- Fanselow, N., Sirajuddin, N., Yin, X. T., Huang, A. J. W., & Stuart, P. M. *Acanthamoeba* Keratitis, Pathology, Diagnosis and Treatment. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, 10(3), 323, 2021.
- Feng, X., Zheng, W., Wang, Y., Zhao, D., Jiang, X., & Lv, S. A Rabbit Model of *Acanthamoeba* Keratitis That Better Reflects the Natural Human Infection. **Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)**, 298(8), 1509–1517, 2015.
- Gonçalves, R. and Mosser, D.M. The isolation and characterization of murine macrophages. **Curr. Protoc. Immunol.** 111:14.1.1-14.1.16, 2015
- Hurt, M., Apte, S., Leher, H., Howard, K., Niederkorn, J., & Alizadeh, H. (2001). Exacerbation of *Acanthamoeba* keratitis in animals treated with anti-macrophage inflammatory protein 2 or antineutrophil antibodies. **Infection and immunity**, 69(5), 2988–2995, 2001.
- Kang, A. Y., Park, A. Y., Shin, H. J., Khan, N. A., Maciver, S. K., & Jung, S. Y. (2018). Production of a monoclonal antibody against a mannose-binding protein of

Acanthamoeba culbertsoni and its localization. **Experimental parasitology**, **192**, 19–24, 2018.

Kawakatsu, K., Ishikawa, M., Mashiba, R., Tran, N. K., Akamatsu, M., & Nishikata, T. Characteristic Morphological Changes and Rapid Actin Accumulation in Serum-MAF-treated Macrophages. **Anticancer research**, **39**(8), 4533–4537, 2019

Laassili, C., Ben El Hend, F., Benzidane, R., Oumeslakht, L., Aziz, A. I., El Fatimy, R., Bensussan, A., & Ben Mkaddem, S. Fc receptors act as innate immune receptors during infection?. **Frontiers in immunology**, **14**, 1188497, 2023.

Leher, H. F., Alizadeh, H., Taylor, W. M., Shea, A. S., Silvany, R. S., Van Klink, F., Jager, M. J., & Niederkorn, J. Y. Role of mucosal IgA in the resistance to *Acanthamoeba keratitis*. **Investigative ophthalmology & visual science**, **39**(13), 2666–2673, 1998.

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**, **84**(10), 2953–2962, 2016..

Neelam, S., & Niederkorn, J. Y. Pathobiology and Immunobiology of *Acanthamoeba* Keratitis: Insights from Animal Models. **The Yale journal of biology and medicine**, **90**(2), 261–268, 2017

Niederkorn J. Y. (2006). See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. **Nature immunology**, **7**(4), 354–359, 2006.

Niederkorn J. Y. The biology of *Acanthamoeba keratitis*. **Experimental eye research**, **202**, 108365, 2021.

Prado-Costa, B., Pinto, L. F., Fonseca, M. F., de Freitas, D., & Alvarenga, L. M. A Synthetic View on *Acanthamoeba Keratitis* Host Immune Response: Potential Factors Influencing the Development of Chronic Inflammation. **Cornea**, **44**(1), 118–127, 2025.

Rayamajhee, B., Willcox, M. D. P., Henriquez, F. L., Petsoglou, C., Subedi, D., & Carnt, N. *Acanthamoeba*, an environmental phagocyte enhancing survival and transmission of human pathogens. **Trends in parasitology**, **38**(11), 975–990, 2022.

Schütze, S., Ribes, S., Kaufmann, A., Manig, A., Scheffel, J., Redlich, S., Bunkowski, S., Hanisch, U. K., Brück, W., & Nau, R. Higher mortality and impaired elimination of bacteria in aged mice after intracerebral infection with *E. coli* are associated with an age-related decline of microglia and macrophage functions. **Oncotarget**, **5**(24), 12573–12592, 2014

Stewart, G. L., Kim, I., Shupe, K., Alizadeh, H., Silvany, R., McCulley, J. P., & Niederkorn, J. Y. Chemotactic response of macrophages to *Acanthamoeba castellanii* antigen and antibody-dependent macrophage-mediated killing of the parasite. **The Journal of parasitology**, **78**(5), 849–855, 1992.

Suryawanshi, A., Cao, Z., Sampson, J. F., & Panjwani, N. IL-17A-mediated protection against *Acanthamoeba* keratitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 194(2), 650–663, 2015

Wang, N., Liang, H., & Zen, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. **Frontiers in immunology**, 5, 614, 2014

Wang, N., Sun, H., Liu, D., Jiang, X., Zheng, M., Zhu, W., Liu, Q., Zheng, W., & Feng, X. Ac-HSP20 Is Associated With the Infectivity and Encystation of *Acanthamoeba castellanii*. **Frontiers in microbiology**, 11, 595080, 2021

Weber-Lima, M. M., Prado-Costa, B., Becker-Finco, A., Costa, A. O., Billilad, P., Furst, C., de Moura, J. F., & Alvarenga, L. M. *Acanthamoeba* spp. monoclonal antibody against a CPA2 transporter: a promising molecular tool for acanthamoebiasis diagnosis and encystment study. **Parasitology**, 147(14), 1678–1688, 2020.