

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE *Acanthamoeba castellanii* E ASPECTOS ATUAIS
RELACIONADOS COM O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS CAUSADAS POR
Acanthamoeba spp.**

VINICIUS JOSÉ MASCHIO

Orientadora: Profa. Dra. Marilise Brittes Rott
Co-orientadora: Dra. Veridiana Gomes Virginio

Porto Alegre
Maio/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE *Acanthamoeba castellanii* E ASPECTOS ATUAIS
RELACIONADOS COM O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS CAUSADAS POR
Acanthamoeba spp.**

Vinicius José Maschio

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – UFRGS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Ambiental.

Orientador(a): Profa. Dra. Marilise Brittes Rott

Co-orientador(a): Dra. Veridiana Gomes Virginio

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Maio/2017

CIP - Catalogação na Publicação

Maschio, Vinicius José
ANÁLISE PROTEÔMICA DE *Acanthamoeba castellanii* E
ASPECTOS ATUAIS RELACIONADOS COM O DIAGNÓSTICO DE
DOENÇAS CAUSADAS POR *Acanthamoeba* spp. / Vinicius
José Maschio. -- 2017.

86 f.

Orientadora: Marilise Brittes Rott.

Coorientadora: Veridiana Gomes Virginio.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. *Acanthamoeba*. 2. Proteômica. 3. SDS-PAGE. 4.
MS/MS. 5. Diagnóstico. I. Rott, Marilise Brittes,
orient. II. Virginio, Veridiana Gomes, coorient.
III. Título.

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

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida e por diariamente se fazer presente nela.

Agradeço a minha família, meus pais e minhas irmãs, minha esposa Keli que, com muito amor e carinho me apoiaram e não mediram esforços para o meu sucesso em mais essa etapa da minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra. Marilise Brittes Rott, impossível expressar o meu agradecimento através de palavras. Obrigado pela amizade, carinho, atenção, dedicação, incentivo, compreensão e principalmente pela confiança depositada em mim.

Agradeço a minha co-orientadora Dra. Veridiana Gomes Virginio pelos ensinamentos e colaboração ímpar no meu trabalho.

Ao professor Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira pela oportunidade de trabalhar no laboratório que coordena, pela atenção e colaboração fundamental para o trabalho.

Aos professores do departamento de parasitologia do ICBS, Kanan, Carlos, Neusa, Márcia e Onilda, pelos anos de ótima convivência, amizade e apoio.

Às Técnicas do laboratório de parasitologia, Silvia e Clarissa, pela amizade e apoio durante o período de doutorado.

Aos meus colegas dos laboratórios do CBIOT/UFRGS.

Aos colegas do laboratório de parasitologia do ICBS.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO) pelo suporte financeiro e técnico nos experimentos de espectrometria de massas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, em especial as professoras Gertrudes Corção e Patricia Valente da Silva.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho e compartilharam comigo o período de pós-graduação, do mestrado ao doutorado.

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE *Acanthamoeba castellanii* E ASPECTOS ATUAIS
RELACIONADOS COM O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS CAUSADAS POR
Acanthamoeba spp.**

Autor: Vinicius José Maschio

Orientadora: Prof^(a). Dr^(a). Marilise Brittes Rott

Co-orientadora: Prof^(a). Dr^(a). Veridiana Gomes Virginio

RESUMO

Acanthamoeba é uma ameba de vida livre, capaz de causar graves infecções como organismo oportunista ou patógeno afetando órgãos como: olhos, pele e sistema nervoso central de humanos, resultado da complexa interação patógeno-hospedeiro, a qual não é totalmente esclarecida. Poucos trabalhos sobre o papel funcional ou patogênico de proteínas que podem ser relevantes no processo de invasão, infecção ou até mesmo para um possível imunodiagnóstico têm sido apresentados. Assim esse trabalho descreve os resultados obtidos a partir de uma análise do repertório de proteínas expressas por trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*, baseado no conjunto de estratégia por SDS-PAGE-MS/MS. Foram identificadas 503 proteínas não redundantes. A classificação funcional das proteínas revelou diversas delas com relevância na sobrevivência do protozoário, nos processos infecciosos de hospedeiros e possíveis alvos para o imunodiagnóstico, incluindo 119 proteínas exclusivas de superfície. No presente trabalho é também apresentada uma revisão da literatura a respeito das técnicas utilizadas no diagnóstico de patologias causadas por *Acanthamoeba* spp. Atualmente o cultivo de material biológico é considerado o padrão ouro no diagnóstico de doenças causadas por *Acanthamoeba* spp. Ferramentas moleculares como a PCR têm sido empregadas para a confirmação do agente etiológico. Ferramentas imunológicas ainda estão sendo estudadas para viabilizar com mais rapidez o diagnóstico preciso das enfermidades causadas por *Acanthamoeba* spp.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (86 p.) maio, 2017.

PROTEOMIC ANALYSIS OF *Acanthamoeba castellanii* and CURRENT ASPECTS RELATED TO THE DIAGNOSIS OF DISEASES CAUSED BY *Acanthamoeba* spp.

Author: Vinicius José Maschio

Advisor: Dr^a. Marilise Brittes Rott

Co-Advisor: Dr^a. Veridiana Gomes Virginio

ABSTRACT

Acanthamoeba is a free-living amoeba, capable of causing severe opportunistic infections in the eyes, skin and central nervous system of humans as a result of the complex pathogen-host interaction is not fully understood. Few works on the functional or pathogenic role of proteins that could be relevant in the process of invasion, infection or even for a possible immunodiagnosis have been presented. Thus in this work we describe the results obtained from an analysis of the repertoire of proteins expressed by *Acanthamoeba castellanii* trophozoites, based on the strategy set by SDS-PAGE-MS / MS. 503 non-redundant proteins were identified. Functional classification of proteins revealed several proteins with relevance to parasite survival, infectious host processes and possible immunodiagnostic targets, including 119 unique surface proteins. This work also carried out a review regarding the techniques used in the diagnosis of pathologies caused by *Acanthamoeba* spp. Currently methodology as the culture in ANN using from biological material is the gold standard in the diagnosis of diseases caused by *Acanthamoeba* spp. Molecular tools such as PCR have been used to confirm the etiologic agent. Immunological tools are still being studied to more quickly enable the accurate diagnosis of *Acanthamoeba* spp.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (86 p.) may, 2017.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
Objetivo Geral	13
Objetivos Especificos	13
3. REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 O gênero <i>Acanthamoeba</i>	14
3.2 Infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i>	19
3.2.1 Ceratite Amebiana	19
3.2.2 Encefalite amebiana granulmatosa e infecções disseminadas causadas por <i>Acanthamoeba</i> spp.....	24
3.3 Relação do sistema imune com as infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i> spp.e fatores de virulência associados a sua patogênese	26
3.4 Estudos proteômicos relacionados com <i>Acanthamoeba</i> spp	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
Capitulo I	34
Capitulo II	63
5. DISCUSSÃO GERAL	70
6. CONCLUSÃO.....	73
7 REFERÊNCIAS.....	74
APÊNCIDES.....	81

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1: Genótipos de *Acanthamoeba* spp. e a sua respectiva patologia associada.18

CAPITULO I34

Tabela 1. Proteins identified (the ten with greater MASCOT score) from trophozoites of *A. castellanii* by LC/MS44

Tabela 2. Top 5 proteins with the highest number of antigenic peptides identified in this study47

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de um trofozoito de *Acanthamoeba*15
- Figura 2. O ciclo de vida de *Acanthamoeba castellanii*16
- Figura 3. Ceratite amebiana23
- Figura 4. Corte coronal dos hemisférios cerebrais com necrose cortical e subcortical de um caso humano fatal de EAG25

CAPITULO I34

- Figura 1. Electrophoretic profiles of *Acanthamoeba castellanii* SF and SEP.....43
- Figura 2. Venn diagram showing the distribution of proteins in different protein extracts.....45
- Figura 3 Functional analysis of proteins identified from *A. castellanii* trophozoites48
- Figura 4. Functional analysis of proteins identified from *A. castellanii* trophozoites49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVL	Amebas de vida livre
ACN	Acetonitrila
AK	<i>Acanthamoeba keratitis</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic local alignment search tool
EAG	Encefalite amebiana granulomatosa
ELISA	Ensaio de imunoadsorção ligado a enzima
FLA	Free-living amoebae
GAE	Granulomatous amoebic encephalitis
GO	Gene ontology
kDa	Kilodalton
Hz	Hertz
LC/MS-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem
M	Molar
MBP	Mannose binding protein
mg	Miligrama
MIP	Manose induced protein
MIP-2	Macrophage inflammatory protein 2
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
Mw	Massa molecular
ng	Nanograma
NK	Natural killer
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PYG	Proteose peptone, yeast extract, glucose
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TFA	Trifluoroacetic acid
U	Unidade
UV	Ultra-violeta
V	Volts
x g	Força centrífuga
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar

1. INTRODUÇÃO

O estudo de organismos parasitários tem sido objeto de pesquisas científicas em todo o mundo devido ao aumento do número de casos descritos. Nos últimos anos é notório o aumento no número de infecções causadas pelo gênero *Acanthamoeba* especialmente casos de ceratite que é quando o microrganismo atinge a córnea produzindo uma infecção progressiva que pode levar à cegueira.

O aumento da incidência de ceratite amebiana muito se deve à popularização do uso de lentes de contato, correspondendo a aproximadamente 80% dos casos. Apesar do número crescente de casos, ocorrem muitas subnotificações, principalmente em função das dificuldades na identificação do agente etiológico pelos métodos aplicados na maioria dos laboratórios clínicos, que se baseiam no cultivo e identificação morfológica do parasito ou na identificação molecular por PCR.

Estudos proteômicos vêm sendo realizados para diversos protozoários. Essas análises têm revelado a diversidade de proteínas expressas por diferentes parasitos, auxiliando na elucidação de mecanismos moleculares utilizados no processo de adesão, invasão e na manutenção da infecção no hospedeiro, além da possibilidade da identificação de biomarcadores potenciais para o imunodiagnóstico.

Poucos estudos proteômicos têm sido realizados a fim de identificar um amplo repertório de proteínas das formas invasivas de espécies de *Acanthamoeba*, o que poderia levar a uma melhor compreensão de quais são as moléculas envolvidas na patogenicidade (fatores de virulência), que podem ser utilizadas como marcadores na diferenciação de isolados patogênicos e não patogênicos em estudos epidemiológicos, além de fornecer informações importantes para o

entendimento das características fisiológicas e bioquímicas do parasito, bem como sobre possíveis mecanismos de evasão da resposta imune e também do estabelecimento e desenvolvimento da infecção.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivos a identificação e caracterização de proteínas expressas por trofozoitos de *Acanthamoeba castellanii*. Paralelamente foi realizada uma revisão a respeito dos principais métodos atualmente utilizados no diagnóstico de patologias causadas por *Acanthamoeba* spp.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar proteínas expressas por formas trofozoíticas de *A. castellanii* através de espectrometria de massas.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Padronizar protocolos de extração de proteínas – fração solúvel e fração enriquecida com proteínas de membrana;

2.2.2 Realizar uma caracterização "*in silico*" das proteínas identificadas;

2.2.3 Caracterizar "*in silico*" o potencial antigênico a partir do número de peptídeos antigênico presentes nas proteínas identificadas;

2.2.4 Realizar uma revisão bibliográfica sobre os aspectos atuais relacionados com o diagnóstico de doenças causadas por *Acanthamoeba* spp.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Gênero *Acanthamoeba*

Protozoários do gênero *Acanthamoeba* pertencem ao filo Sarcomastigophora e estão entre os mais isolados na natureza (Siddiqui & Khan, 2012). Esse organismo possui microprojeções formadas por citoplasma hialino, denominadas acantopódios (caracterizando morfologicamente os trofozoítos do gênero), os quais permitem seu deslocamento e são responsáveis pela adesão a superfícies tanto biológicas como também inertes (Khan, 2006).

Amebas de Vida Livre (AVL) deste gênero são isoladas dos mais diversos ambientes, como solo, poeira, fontes naturais de água, reservatórios, água do mar, água de torneira, piscinas, soluções de lentes de contato, ambientes hospitalares, entre outros (Siddiqui and Khan, 2012). Assim, não é surpreendente que a maioria dos indivíduos saudáveis demonstre a presença de anticorpos anti-acanthamoeba, indicando a nossa exposição comum a esses patógenos (Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

Acanthamoeba spp. apresentam duas formas evolutivas: trofozoíto e a forma de cisto. Os trofozoítos, que possuem normalmente um tamanho aproximado de 12-35 μm de diâmetro, são formas multiplicativas (assexuada/fissão binária), de locomoção (movimentos polidirecionais através da emissão de pseudópodes globosos e hialinos, de onde surgem finos pseudópodes semelhantes a espinhos, chamados de acantopódios) (Figura 1). Amebas do gênero *Acanthamoeba* alimentam-se principalmente pela fagocitose de diversos microorganismos (bactérias, algas, fungos, leveduras), matéria orgânica e/ou a inclusão de partículas líquidas para dentro de vacúolos que se fazem presentes dentro da célula amebiana (Khan, 2006; Lorenzo-Morales *et al.* 2015).

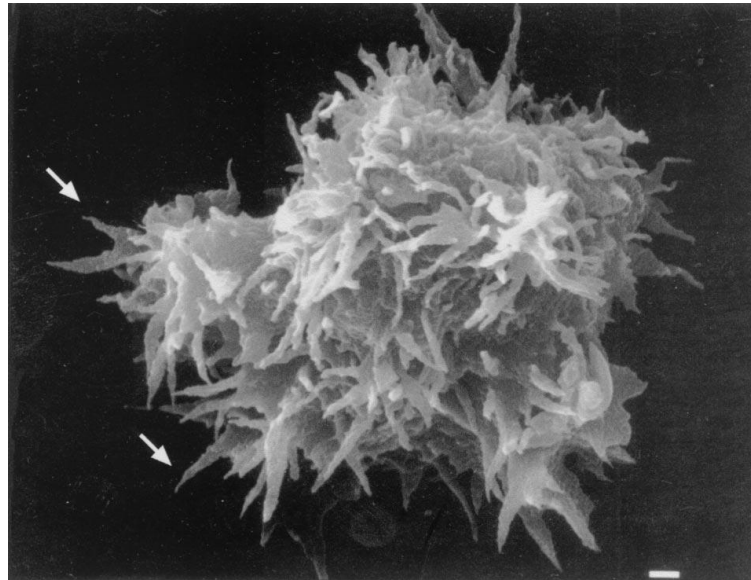


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura de um trofozoito de *Acanthamoeba*. As estruturas superficiais espinhosas chamadas acanthopódios (setas) distinguem esse gênero de outras amebas de vida livre que infecta seres humanos. Barra: 1 μm . Fonte: Marciano-Cabral & Cabral, 2003.

Os cistos por sua vez, são formas de resistência que favorecem a perpetuação e consequentemente a dispersão dos organismos no ambiente (Khan, 2009). Com tamanho aproximado de 10-25 μm , os cistos podem classificar-se em 3 grupos (I, II e III) de acordo com sua morfologia (Pussard & Pons 1977). Cistos de *Acanthamoeba* spp. são resistentes a uma variedade de adversidades, como: variações de temperaturas, congelamento, radiação ultravioleta, cloro, herbicidas e pesticidas (Leitsch *et al.*, 2010). Estudos demonstram a possibilidade de cistos de *Acanthamoeba* sobreviverem a dissecação por mais de 20 anos (Carvalho *et al.* 2009).

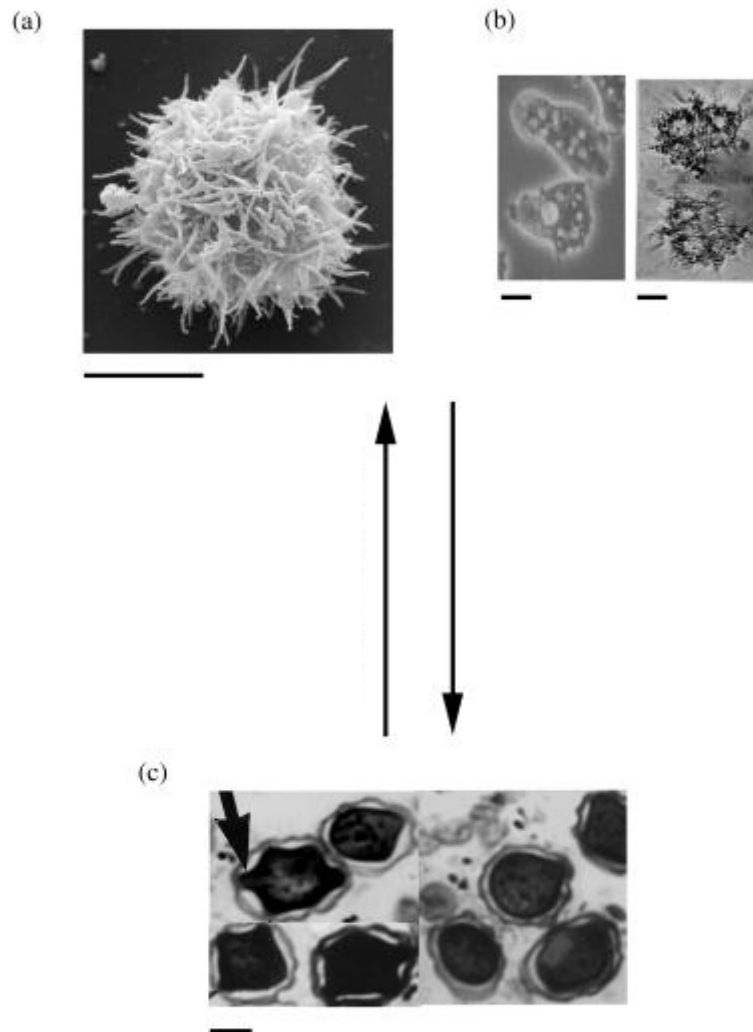


Figura 2: O ciclo de vida de *Acanthamoeba castellanii*. Forma infectante de *A. castellanii*, também conhecidos como trofozoítos é observada em (A). Microscopia eletrônica de varredura e em (B) microscopia de contraste de fase. Sob condições desfavoráveis, os trofozoítos se diferenciam em cistos (C). Forma de cistos de *A. castellanii*, caracterizado por parede dupla como indicado por seta. Barra = 5 μ m.

Fonte: Khan, 2006.

Acanthamoeba spp. não necessitam de um hospedeiro para completar o seu ciclo de vida, sendo parasito facultativo ou oportunista, sendo assim definidas como anfizóicas devido a sua capacidade de existir normalmente como organismos de vida livre e de sobreviver ou ainda causar infecções em tecidos de seres humanos e outros animais (Visvesvara *et al.*, 2007).

Atualmente a taxonomia molecular descreve 20 genótipos diferentes dentro do gênero *Acanthamoeba*, sendo eles nomeados T1, T2a, T2b até T20, baseados no sequenciamento do gene que codifica a subunidade menor (SSU) do rRNA (Stothard *et al.*, 1998; Maghsood *et al.*, 2005; Corsaro & Venditti, 2010; Nuprasert *et al.*, 2010; Corsaro *et al.*, 2015). Os genótipos T2, T3, T4, T6 e T11 têm sido isolados clinicamente como agentes causadores da ceratite amebiana, sendo o genótipo T4 o principal causador desta patologia (Siddiqui and Khan, 2012). A correlação de genótipo e doença é apresentada na tabela 1.

Tabela 1: Genótipos de *Acanthamoeba* spp. e a sua respectiva patologia associada.

<i>Acanthamoeba</i> / Genótipos	<i>Infecção Associada</i>
T1	Encefalite
T2a	Ceratite / Encefalite
T2b	NR
T3	Ceratite
T4	Ceratite / Encefalite
T5	Ceratite / Encefalite
T6	Ceratite
T7	NR
T8	NR
T9	NR
T10	Ceratite / Encefalite
T11	Ceratite
T12	Encefalite
T13	NR
T14	NR
T15	Ceratite
T16	NR
T17	NR
T18	NR
T19	NR
T20	NR

NR: Nenhuma patologia associada ao genótipo até o momento.

Fonte: Adaptado de Siddiqui & Khan (2012).

3.2 Infecções causadas por *Acanthamoeba* spp.

Dentre as infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. destaca-se a ceratite amebiana, uma infecção não oportunista pois acomete indivíduos hígidos e está diretamente associada com usuários de lentes de contato. Mais raramente porém com altíssimo índice de mortalidade (acima de 90%), *Acanthamoeba* spp. também pode causar Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) e outras infecções disseminadas em indivíduos imunocomprometidos (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Visvesvara *et al.*, 2007; Siddiqui & Khan 2012).

3.2.1 Ceratite amebiana

Espécies do gênero *Acanthamoeba* são agente causadores de uma infecção na córnea denominada ceratite amebiana (AK) e já é reconhecida como uma infecção ocular severa (Dart *et al.* 2009).

A ceratite amebiana é uma infecção ocular grave, que se caracteriza pela perda gradual da visão, chegando, em alguns casos, a provocar cegueira (Lorenzo-Morales *et al.* 2015). Estudos demonstram que aproximadamente 83% dos casos de ceratite por *Acanthamoeba* spp. ocorrem em usuários de lentes de contato (Carvalho *et al.*, 2009).

O uso de lentes de contato na população em geral apresenta um crescimento contínuo (mais de 20 milhões de usuários apenas nos Estados Unidos) bem como a sua manipulação, manutenção e seu uso de forma incorreta (Illingworth & Cook, 1998; Lorenzo-Morales *et al.* 2015).

Embora a ceratite amebiana possa ocorrer em indivíduos que não fazem o uso de lentes de contato, essa enfermidade está principalmente associada com o seu uso (Graffi *et al.* 2013). Entretanto, trata-se de um processo multifatorial que envolve: desgaste de lentes de contato devido a utilização por tempo prolongado, a falta de higiene pessoal, limpeza inadequada de lentes de contato e conseqüentemente a formação de biofilmes nas lentes, contato com água contaminada e

também a manipulação equivocada.

A sequência de eventos da ceratite causada por *Acanthamoeba* envolve a adesão, desagregação/destruição da barreira epitelial, a invasão do estroma pelas amebas, depleção de ceratócitos, indução de uma resposta inflamatória e conseqüentemente necrose estromal com conseqüências cegantes (Lorenzo-Morales *et al.* 2015).

O número de casos diagnosticados aumentou consideravelmente durante os últimos anos, estimando-se até 60 casos de ceratite amebiana para cada 30.000 usuários de lentes de contato (Henriquez *et al.*, 2009). Estudos têm demonstrado um significativo aumento do número de pacientes com ceratite amebiana nos em diversos países ao redor do mundo, inclusive no Brasil (Thebpatiphat *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2009; Ku *et al.*, 2009; Gatti *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2010).

São escassos os dados epidemiológicos descritos sobre a prevalência de ceratite amebiana no Brasil. Relatos de casos são descritos, como o realizado por Carvalho *et al.* (2009), onde foi desenvolvida uma investigação sobre casos de ceratite amebiana em um centro de oftalmologia da cidade de São Paulo, relatando um aumento significativo no número de casos ao longo dos anos, sendo que entre os anos de 1987 e 2001, 66 casos foram relatados (média de 4,71 casos/ano). Já entre nos anos de 2004 e 2006, 65 casos foram descritos (média de 21,6 casos/ano).

Os sintomas da ceratite amebiana são muito semelhantes aos da ceratite causada por vírus, fungos e bactérias, e em muitos casos ocorre identificação incorreta do agente etiológico, sendo muitas vezes a infecção amebiana lembrada após falha no tratamento de forma empírica (Lorenzo-Morales *et al.* 2015). O uso de lentes de contato associado à dor local intensa em pacientes com infecção ocular é indicativo de ceratite amebiana (Siddiqui & Khan 2012).

A higienização das lentes de contato é um processo de enorme importância para evitar que o protozoário se instale nas lentes. Diversos sacarídeos incluindo manose, glicose, sacarose, galactose,

frutose e outras moléculas tais como proteínas, glicoproteínas, lipídeos, mucinas, cálcio, ferro, magnésio, sódio, podem ser encontrados na superfície das lentes de contato depois de seu uso (Siddiqui & Khan 2012). Estas moléculas podem atuar como receptores para trofozoítos de *Acanthamoeba*, viabilizar a formação de biofilme e/ou aumentar a habilidade de ligação do parasito às lentes de contato (Khan, 2006).

Quando em contato com a córnea, os trofozoítos aderem e penetram no epitélio (Lorenzo-Morales *et al.* 2015). Esta aderência é mediada por uma proteína de ligação a manose (mannose-binding protein of *Acanthamoeba*) da membrana do trofozoíto, que se liga à manose de glicoproteínas do epitélio (Hurt *et al.* 2003). Estudos sugerem que enzimas como neuraminidase, elastase e várias proteases produzidas pelo protozoário podem ser fatores que determinam a infecção por *Acanthamoeba* (Alves, 2012). Após a penetração, o processo infeccioso segue com ulcerações, infiltrado neutrofílico em forma de anel e inflamações (Alves, 2012). Moléculas como IgA e proteases, presentes no fluido lacrimal, geralmente garantem a proteção, uma vez que impedem a aderência de *Acanthamoeba*, processo chave na patogenicidade da ceratite amebiana (Saravanan *et al.*, 2008).

Dentre os métodos utilizados em laboratórios clínicos, o cultivo de biópsia/raspado da córnea e microscopia do raspado da córnea e/ou exame histopatológico da córnea corados com hematoxilina-eosina ou branco de calcoflúor, que reage especificamente com as paredes celulósicas dos cistos de *Acanthamoeba*, são amplamente utilizados (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

A microscopia confocal *in vivo* surgiu como uma importante ferramenta não invasiva auxiliando no diagnóstico de ceratite amebiana grave (Khan, 2006; Matsumoto *et al.*, 2007; Claerhout *et al.*, 2004). Metodologias baseadas em ferramentas moleculares como a PCR ou a PCR em tempo real também foram desenvolvidas para a detecção de *Acanthamoeba*, já que existem sequências de reconhecimento

específicas para o gênero em questão (Lehmann *et al.*, 1998; Qvarnstrom *et al.*, 2006; Goldschmid *et al.*, 2012). No entanto, para esse tipo de diagnóstico, há necessidade de procedimentos invasivos de raspagem da lesão ocular, sendo esse procedimento de extrema importância tendo em vista a possibilidade de um resultado falso negativo.

O tratamento atual para a ceratite amebiana consiste em agentes antimicrobianos tópicos, que possam atingir altas concentrações no local da infecção (Clarke *et al.* 2012; Lorenzo-Morales *et al.* 2015). Devido à existência de uma forma de cisto, que é altamente resistente à terapia, geralmente é utilizada uma combinação de agentes (Roberts & Henrique 2010; Lorenzo-Morales *et al.*, 2015). A maioria deles tem ação sobre os trofozoítos, mas pouco efetivos sobre os cistos, o que leva a recidiva das infecções na maioria dos casos (Schuster & Visvesvara, 2004; Khan, 2006; Dart *et al.*, 2009).

Biguanidas (PHMB - Polihexametileno biguanida) é atualmente a primeira opção no tratamento de ceratite amebiana, que inclui também clorexidina, neomicina e outros fármacos (Clarke *et al.* 2012; Lorenzo-Morales *et al.* 2015). A utilização de esteróides ainda é discutida e controversa, sendo indicado a avaliação de cada caso de forma isolada (Dart *et al.*, 2009; Clarke *et al.* 2012) .

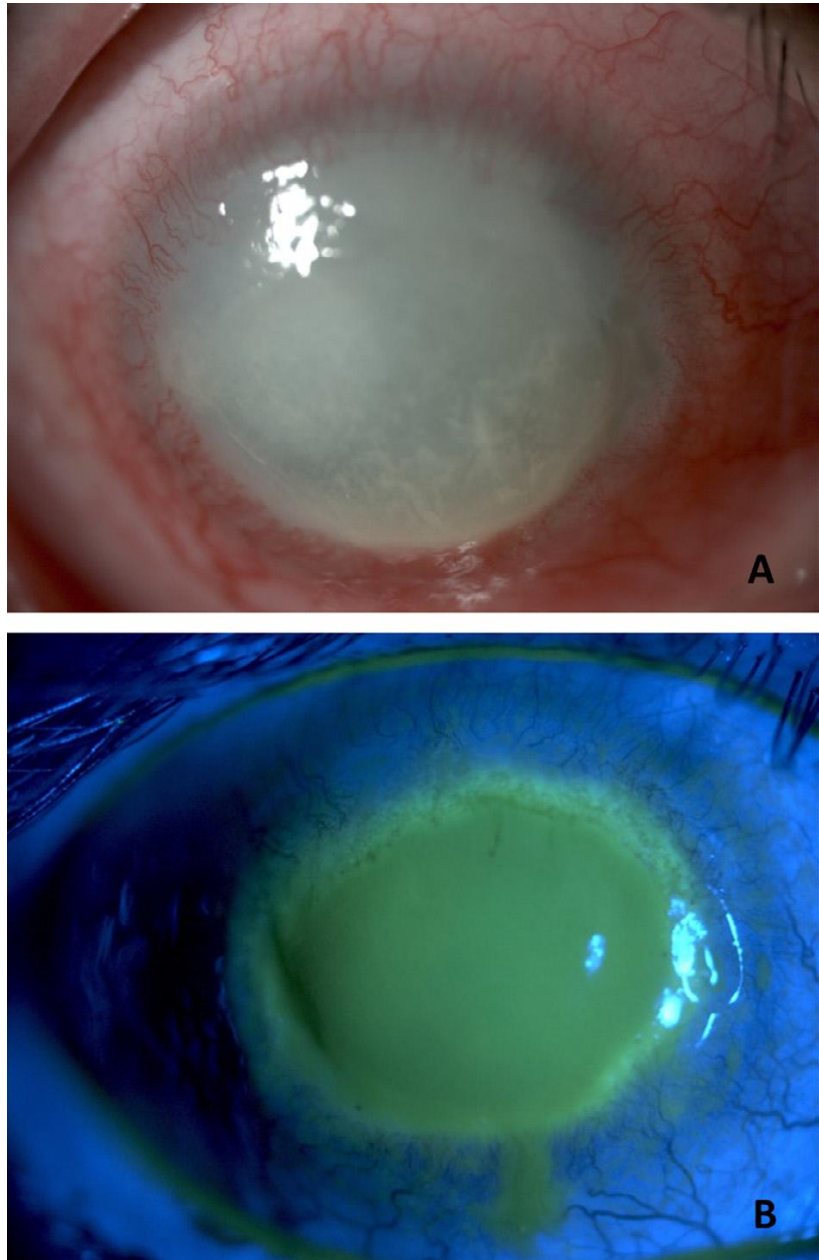


Figura 3: Ceratite amebiana. A - Dano da córnea ocasionado por ceratite amebiana. B – Visualização da lesão após aplicação de fluoresceína sódica. Fonte: Lorenzo-Morales *et al.* (2015).

3.2.2 Encefalite Amebiana Granulomatosa e Infecções disseminadas causada por *Acanthamoeba* spp.

A encefalite amebiana granulomatosa (EAG) é uma infecção rara, mas quase sempre fatal (Ong *et al.* 2017). Considerada uma infecção oportunista, pois quase todos os casos relatados até o momento se referem a indivíduos imunologicamente debilitados, especialmente aqueles que já sofreram algum tipo de situação imunossupressora como alcoolismo, gravidez, quimioterapia, ou uso corticoterapia ou ainda pacientes com AIDS (Visvesvara *et al.*, 2007; Thamtam *et al.* 2016).

Com o avanço da medicina, o número de transplantes tem aumento de forma importante, entretanto esse procedimento leva a uma imunossupressão medicamentosa, viabilizando um processo infeccioso causado pela *Acanthamoeba* (Barete *et al.* 2007; Brondfield *et al.* 2017). São vários os relatos de casos descritos na literatura de indivíduos que durante uma imunodepressão devido ao procedimento cirúrgico (transplante) acabaram desenvolvendo encefalite e/ou infecção disseminada e na maioria das vezes o paciente vai a óbito (Barete *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2010).

Os mecanismos associados com a patogênese não são claros, mas as complicações envolvem o sistema nervoso central, onde há indução de uma resposta inflamatória, devido a invasão da ameba através da barreira hematoencefálica e a ligação ao tecido, seguida de lesão neuronal e necrose (Schuster & Visvesvara, 2004; Khan, 2006). A invasão ocorre pela pele (ulcerações) ou pelo trato respiratório, seguindo então por via sanguínea até o sistema nervoso central (Martinez & Visvesvara, 1997; Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

O período de incubação pode variar de dias, semanas e até meses (Schuster & Visvesvara, 2004). Após esse período, vários sintomas aparecem todos eles semelhantes a uma meningite bacteriana: dor de cabeça acompanhada de febre, náuseas, vômitos, letargia, aumento da pressão intracraniana, mudança da personalidade

e coma (Marciano-Cabral *et al.*, 2000). Como o desenvolvimento da pode ser fulminante, o diagnóstico muitas vezes só é obtido após a necropsia (figura 4), por análise do fluido cérebro-espinhal ou do próprio tecido cerebral, através da análise microscópica das formas trofozoíticas e/ou císticas (Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

A constatação de altos níveis de anticorpos *Acanthamoeba*-específicos pode direcionar o diagnóstico, além de métodos de cultura utilizando liquor ou ainda a PCR (Khan, 2003; Schuster & Visvesvara, 2004; MacLean *et al.*, 2007; Visvesvara *et al.*, 2007). O tratamento da EAG é extremamente problemático, especialmente pela falta de sintomas específicos e de métodos diagnósticos eficientes (Visvesvara *et al.*, 2007).

Normalmente, os pacientes com comprometimento do SNC são tratados com um coquetel de antibióticos e anti-fúngicos, como, rifampicina, trimetropina, cetoconazol e anfotericina B (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Todavia, o sucesso no prognóstico é baixo, devido à demora do diagnóstico, o estado imunodeficiente do paciente e à falta de drogas específicas para eliminar o patógeno.

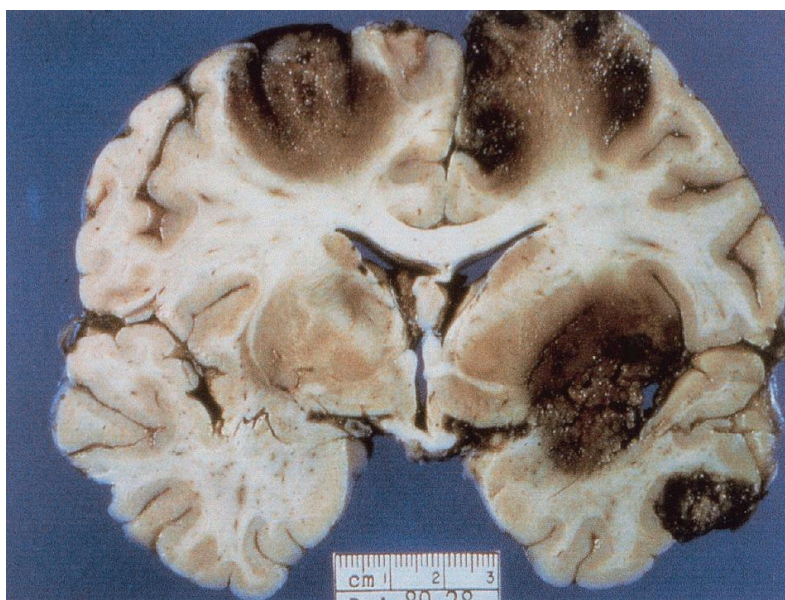


Figura 4: Corte coronal dos hemisférios cerebrais com necrose cortical e subcortical de um caso humano fatal de EAG. Fonte: Marciano-Cabral & Cabral (2003).

3.3 Relação do sistema Imune com as infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. e fatores de virulência associados à patogênese de *Acanthamoeba* spp.

A exposição ambiental a *Acanthamoeba* spp. é inevitável devido a ubiquidade do microrganismo, sendo que as formas ativas do parasito são isoladas a partir de material biológico como a mucosa oral e nasofaringe de indivíduos assintomáticos (Khan, 2006; Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

A resposta imunológica do hospedeiro tem um papel fundamental na proteção do indivíduo, e vai desde a produção de anticorpos séricos contra *Acanthamoeba* spp. até a dependência do estado imunológico do indivíduo para o estabelecimento de outras infecções oportunistas ou da EAG (Clarke & Niederkorn, 2006). Entretanto os mecanismos de defesa imunológica do hospedeiro não estão totalmente caracterizados (Siddiqui & Khan, 2012).

A recorrência de infecções por *Acanthamoeba* é comum, demonstrando assim que a infecção corneana não induz imunidade protetora contra os antígenos parasitários (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015). Entretanto sabe-se que a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa participam das defesas do hospedeiro contra *Acanthamoeba* spp. (Sun, 2008).

Segundo estudos conduzidos por Alsam *et al.* (2008) revelaram que fatores como lisozima, lactoferrina, beta-lisinas, prostoglandinas e outros compostos com propriedades antimicrobianas e imunológicas não apresentaram efeitos significativos na interação da *Acanthamoeba* com a célula epitelial da córnea. Isolados patogênicos de *Acanthamoeba* têm demonstrado a capacidade de degradar quimicinas e citocinas, anticorpos, proteínas envolvidas no sistema complemento e até de destruir macrófagos.

Na resposta imune inata, os neutrófilos e macrófagos são determinantes na defesa contra *Acanthamoeba*, apesar de aumentarem a resposta inflamatória local, a diminuição dessas células

de defesa resultou na exacerbação da ceratite amebiana em cobaias (Van Kilnk *et al.*, 1996). Os dois tipos celulares citados, tem a capacidade de destruir *Acanthamoeba* spp., sendo os principais componentes dos granulomas encontrados nos tecidos infectados nas infecções cutâneas (Clarke *et al.*, 2006; Sun 2008).

Quadros relacionados com a diminuição imunológica, os macrófagos perdem o potencial quimiotático para *Acanthamoeba* spp., permitindo o estabelecimento e o agravamento do quadro infeccioso da EAG (Marciano-Cabral *et al.*, 2001; Marciano-Cabral *et al.*, 2006).

Estudos em modelo animal mostraram a atividade de células NK (natural killer) significativamente aumentadas em animais infectados por *Acanthamoeba*, sugerindo que as células NK desempenham um papel na importante imunidade protetora (Michalek *et al.*, 2013).

Com relação à resposta imune adaptativa, é notória a produção de anticorpos anti-*Acanthamoeba* em indivíduos saudáveis, (Nieder Korn, 2002). O papel dos anticorpos na defesa do organismo contra a ceratite amebiana ainda precisa ser elucidado. Anticorpos IgA, presentes nas lágrimas, são efetivos na proteção contra a adesão de *Acanthamoeba* spp. a células da córnea (Clarke & Nieder Korn, 2006). Contudo, em pacientes infectados, o nível desta imunoglobulina cai drasticamente, indicando que algum mecanismo deve regular a produção deste anticorpo (Alizadeh *et al.*, 2001). Com relação à IgG, um aumento foi observado em pacientes com ceratite amebiana (Alizadeh *et al.*, 2001).

Animais experimentais imunizados oralmente com antígenos de *Acanthamoeba* mostraram taxas de infecção significativamente mais baixas em comparação com o controle (21,4% versus 72,6%, respectivamente) e a proteção foi associada a níveis mais elevados de IgA parasito-específica (Siddiqui & Khan, 2012).

A imunização oral utilizando proteína de ligação e manose (MPB) recombinante melhorou AK e a proteção foi associada também com a presença de níveis elevados de IgA anti-MBP nos animais

imunizados.

Entretanto a capacidade de um organismo causar dano é um evento multifatorial e não depende exclusivamente de fatores imunológicos do hospedeiro (Siddiqui & Khan, 2012).

Fatores que contribuem para a patogenicidade e que estão diretamente relacionados com a ameba são: a capacidade de adesão do patógeno a célula do hospedeiro, fagocitose, a presença de fatores de virulência como elastases, proteases e fosfolipases. Fatores que contribuem indiretamente a patogênese são: a tolerância fisiológica da ameba como: termotolerância, osmotolerância e crescimento em diferentes faixas de pH, a resistência a fármacos que o microorganismo apresenta entre outros (Lorenzo-Morales *et al.* 2015).

Isolados de *Acanthamoeba* spp. provenientes de casos de clínicos apresentam boa termotolerância, maior taxa de crescimento, habilidade de aderir a células do hospedeiro, excreção de produtos citotóxicos que possibilitam a evasão das células do sistema imune (Lorenzo-Morales *et al.*, 2013).

Isolados virulentos apresentavam adesão diferencial a proteínas encontradas na matrix extracelular. Estudos têm destacado o papel da proteína ligadora de manose (MBP - *mannose binding protein* com 28.2 kDa) no processo de adesão e também da laminin-binding protein (proteínas de ligação a laminina 55 kDa) (Hong *et al.*, 2004; Rocha-Azevedo *et al.* 2009).

Níveis destas proteínas estão elevados em isolados patogênicos, quando comparados com isolados ambientais (Visvesvara *et al.*, 2007; Panjwani, 2010; Siddiqui & Khan, 2012).

Na patogênese da encefalite por *Acanthamoeba* spp., MBPs possibilitam a ligação de trofozoítos à célula alvo, que aciona uma cascata de sinalização associada a proteínas que atuam na degradação de proteínas estruturais do SNC (Siddiqui *et al.*, 2011).

A ligação entre trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. e resíduos de manose induz à secreção de moléculas citotóxicas, como a proteases, MIP 133 (*mannose induced protein 133*). A MIP 133 induz

apoptose de ceratócitos, de células da íris, retina e córnea (Clarke and Niederkorn, 2006). Anticorpos produzidos contra MIP-133 foram capazes de reduzir os sintomas da ceratite amebiana em modelos animais imunizados (Hurt *et al.*, 2003).

Acanthamoeba spp. produzem serino, cisteíno e metalo proteases, que possuem capacidade de degradar diversos substratos protéicos (Alizadeh *et al.*, 2008). O papel primário das proteases produzidas pela *Acanthamoeba* é degradar substâncias para viabilizar a fagocitose. Isolados patogênicos exibem uma atividade aumentada na secreção de proteases, viabilizando a invasão no hospedeiro além de contribuírem diretamente para o dano celular (Clarke & Niederkorn, 2006; Kim *et al.*, 2006). Por degradarem uma variedade de substratos proteicos (imunoglobulinas, interleucinas, elastina, fibronectina, colágeno tipo I e IV) essas proteases permitem a evasão da resposta imune do hospedeiro ao mesmo tempo que possibilitam a invasão tecidual (Cho *et al.*, 2000; Alizadeh *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009). Alsam *et al.* (2005) demonstraram, que ao estudar uma protease de 133 kDa, que quando em contato com células que formavam um modelo *in vitro* da barreira hemato-encefálica, aumentava em 80% a permeabilidade desta, caracterizando seu forte efeito citopático.

Estas enzimas parecem estar relacionadas a EAG, capazes de degradar tecido conectivo, causar lesões desmientilizantes e necrose em neurônios no SNC (Mortazavi *et al.*, 2011).

Proteínas formadoras de poros na membrana celular do hospedeiro provocam alteração na pressão osmótica, induzindo a desorganização iônica e, conseqüentemente, morte celular (Michalek *et al.*, 2013). Recentemente, uma toxina formadora de poro, denominada acanthaporina foi identificada em *A. culbertsoni* (Michalek *et al.*, 2013). A expressão recombinante da proteína em bactérias permitiu verificar que a mesma foi citotóxica para células neuronais humanas e exerceu atividade antimicrobiana contra uma variedade de estirpes bacterianas por causar permeabilização das suas membranas (Michalek *et al.*, 2013).

Alguns estudos também sugerem que *Acanthamoeba* spp. são capazes de induzir morte celular programada (apoptose) nas células hospedeiras (Siddiqui & Khan, 2012), fato demonstrado pela observação de características típicas de apoptose, tais como formação de poros, formação de corpos apoptóticos, condensação da cromatina nuclear e presença de DNA fragmentado em células hospedeiras infectadas (Chusattayanond *et al.*, 2010).

Fosfolipases também parecem estar relacionadas a virulência da ameba. Vários estudos têm demonstrado que *Acanthamoeba* patogênica que exibe efeitos citopáticos em células de mamíferos *in vitro* liberam mais fosfolipase, sugerindo assim o seu envolvimento em infecções por *Acanthamoeba* spp. Devido a sua característica biológica, a destruição da membrana celular das células do hospedeiro parece ser o papel mais evidente relacionado com essa enzima (Mortazavi *et al.*, 2011; Im K., 1990)

Outros fatores que podem contribuir para a patogênese de *Acanthamoeba* spp. incluem glicoproteínas denominadas ecto-ATPases, que estão na superfície celular e tem a capacidade de hidrolisar ATP extracelular (Sissons *et al.*, 2004). O ADP resultante tem efeitos citotóxicos para a célula do hospedeiro. Sissons *et al.* (2004) demonstraram que isolados clínicos de *Acanthamoeba* spp. expressam elevados níveis de ecto-ATPase comparados a isolados ambientais. Durante a infecção por *Acanthamoeba* spp., ATP hidrolisado sob a forma de ADP atua sobre os receptores purinérgicos P2Y2 presentes na célula hospedeira levando à apoptose de células monocíticas (Mattana *et al.*, 2002). Além disso, a actividade de ecto-ATPase aumenta na presença de manose, consequentemente favorecendo a adesão amebiana (Sissons *et al.*, 2004).

A enzima superóxido dismutase, que catalisa a conversão de superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio e tem importante papel na defesa antioxidante. Duas enzimas superóxido dismutase foram caracterizadas em *A. castellanii* (SOD I e SOD II) (Choi *et al.*, 2000). Recentes estudos acerca das propriedades bioquímicas e

funcionais da superóxido dismutase de *A. castellanii* demonstraram altos níveis de expressão da enzima sob condições de estresse oxidativo, sugerindo que esta enzima pode ter papel essencial na sobrevivência do parasito no hospedeiro por detoxificar tanto os superóxidos produzidos pelo próprio parasito de forma endogena, como também pelas células de defesa do sistema imune do hospedeiro (Kim *et al.*, 2012).

Além dos fatores de virulência acima mencionados, que estão diretamente relacionados com a patogenicidade da ameba, a capacidade de *Acanthamoeba* sobreviver em condições ambientais adversas e sua resistência a fármacos usados para o tratamento por viabilizar a diferenciação em cistos contribui para a sua patogenicidade. Entretanto, muitos aspectos ainda devem ser elucidados para a completa compreensão desses processos.

3.4 Estudos proteômicos relacionados com *Acanthamoeba* spp.

A proteômica tem como objetivo estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, interações entre proteínas, mecanismos regulatórios e a sua influência na biologia de um organismo (Blackstock & Weir, 1999). Uma descrição completa do proteoma de um microorganismo fornece, não apenas um conjunto de proteínas que está sendo expresso pelo genoma, mas também dados de expressão celular sob condições controladas e definidas (Cash, 1998). Estudos proteômicos vêm sendo realizados para diversos protozoários (Tolstrup *et al.*, 2007; Biller *et al.*, 2009; Wen & Garg, 2012; Jerlström-Hultqvist *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2012; Urbaniak *et al.*, 2012; Pawar *et al.*, 2012). Essas análises têm revelado a diversidade de proteínas expressas por diferentes parasitos, auxiliando na elucidação de seus mecanismos moleculares na interação com espécies hospedeiras, que possibilitam a manutenção da infecção e na identificação de marcadores potenciais para o imunodiagnóstico e até o

desenvolvimento de novos fármacos.

Poucos estudos proteômicos foram descritos para *Acanthamoeba* spp., dentre eles algumas abordagens relacionadas a investigação de proteínas expressas durante a fase de encistamento, e de proteínas secretadas a partir de isolados clínicos (Bouyer *et al.*, 2009; Leitsch *et al.*, 2010). Caumo *et al.* (2014) realizaram uma análise do repertório de proteínas expressas por *Acanthamoeba polyphaga*, permitindo a identificação de proteínas possivelmente envolvidas na patogenicidade e/ou virulência e também proteínas antigênicas. Mais recentemente Sánchez *et al.* (2016), observaram a partir de ensaios utilizando a técnica de ELISA, que a proteína de superfície denominada calreticulina tem potencial para um possível imunodiagnóstico.

Assim sendo, estudos que envolvam a identificação e caracterização de proteínas a partir de trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. podem fornecer informações relevantes que auxiliem tanto na compreensão da biologia deste protozoário bem como possibilite a otimização de uma ferramentamenta de imunodiagnóstico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da presente tese estão organizados em dois capítulos apresentados na forma de artigos científicos.

No capítulo 1 é apresentado o artigo intitulado “Proteomic analysis from of trophozoites *Acanthamoeba castellanii*”, submetido na revista *Parasitology*. Este artigo descreve o primeiro estudo proteômico de *A. castellanii* e estabelece uma análise abrangente das proteínas expressas por trofozoítos.

No capítulo 2 é apresentado o artigo intitulado “Current Aspects Related to the Diagnosis of *Acanthamoeba* Infections - A Brief Review”, a ser submetido para publicação.

Outras publicações foram realizadas durante o período do doutorado e serão apresentadas como apêndice, ao final da presente tese.

CAPÍTULO I

Artigo intitulado “Proteomic analysis from of trophozoites *Acanthamoeba castellanii*”, submetido na revista *Parasitology*.

Proteomic analysis from of trophozoites *Acanthamoeba castellanii*

VINICIUS JOSÉ MASCHIO¹, VERIDIANA GOMES VIRGINIO², HENRIQUE BUNSELMAYER FERREIRA^{2,3} and MARILISE BRITTES ROTT^{1,4*}

1 Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

2 Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

3 Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

4 Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author: Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Porto Alegre, Brazil.

E-mail: marilise.rott@ufrgs.br

SUMMARY

Acanthamoeba spp. are an opportunistic parasite protozoan which are the causative agent of granulomatous amoebic encephalitis and *Acanthamoeba* keratitis. These amoebae feed on bacteria, but are also frequent hosts of microorganisms symbionts. The parasite adhesion to the host cell is the primary step for infection. There is no full understanding of *Acanthamoeba* spp. proteins relevant for host invasion or infection. In this study, an analysis of the proteins expressed by *A. castellanii* trophozoites, based on complementary LC-MS/MS of tryptic peptides from SDS-PAGE approaches was performed. A total of 503 proteins were identified. Of these, 308 proteins were identified in the soluble fraction, 119 in surface-enriched protein and 76 proteins were identified in both fractions. Functional classification together with the determination of antigenic peptides revealed several proteins with potential importance for pathogen survival, infection of mammalian hosts and immunodiagnostic. Our study provided a proteomic analysis of the trophozoite stage of *Acanthamoeba castellanii* and established foundations for prospective, comparative and functional studies of proteins involved in many mechanisms in *Acanthamoeba castellanii* and also in other *Acanthamoeba* species.

Key words: *Acanthamoeba castellanii*, trophozoite, proteomic, functional classification, antigenic peptides.

INTRODUCTION

Free-living amoebae (FLA) belonging to the *Acanthamoeba* genus are an opportunistic protozoan that are widely distributed in the environment (Visvesvara, 2013). *Acanthamoeba* spp. has two developmental stages: the trophozoite, a vegetative feeding form and the cyst a resting form with minimal metabolic activity (Greub and Raoult, 2004; Lorenzo-Morales *et al.* 2015). Species of the genus *Acanthamoeba* are frequently found both, in natural and artificial niches, oftentimes feeding on microorganisms present on surfaces of these environments (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Siddiqui and Khan, 2012). Many *Acanthamoeba* isolates harbor endosymbionts which may include viruses, yeast, protists and bacteria, some of which are potential human pathogens (Siddiqui and Khan, 2012). *Acanthamoeba* has a versatile role in the ecosystem and their ability to capture prey by phagocytosis, acting as vectors, reservoirs and as a Trojan horse of these microbial pathogens (Guimaraes *et al.* 2016; Lorenzo-Morales *et al.* 2015).

Discovered in a culture of *Cryptococcus parvovirus* (fungus) by Castellani in 1930, currently the molecular classification of *Acanthamoeba* strains has allowed clustering of these genus into 20 different genotypes (T1–T20), T4 being the most prevalent genotype in the clinical cases (Corsaro *et al.* 2015; Visvesvara *et al.* 2007; Lorenzo-Morales *et al.* 2015).

This protozoan genus is recognized as agent of Amoebic Keratitis (AK) (typically associated with the use of contact lenses) and may also cause a rare form of encephalitis known as granulomatous amoebic encephalitis (GAE) and disseminated infections mostly in immunosuppressed patients (Khan, 2006; Lorenzo-Morales *et al.* 2015; Visvesvara, 2013; Lakhundi *et al.* 2016). AK is increasingly, being recognized as a severe sight - threatening ocular infection (Baig, 2015; Lorenzo-Morales *et al.* 2015). Patients with AK may experience pain with photophobia, ring-like stromal infiltrate, epithelial defect and lid oedema (Lorenzo-Morales *et al.* 2015). If AK is not treated adequately and aggressively, it can lead to loss of vision (Bouheraoua *et al.* 2013). The culture remains the gold standard of *Acanthamoeba* laboratory diagnosis, but today several PCR-based techniques are also well established and usually increase sensitivity significantly

(Lorenzo-Morales *et al.* 2015; Ricciardi and Ndao, 2015). In patients that have already been pre-treated with antibiotics, amoeba density is usually very low, making it more difficult and time consuming diagnosis (Lorenzo-Morales *et al.* 2015). Currently immunological techniques are not available for the diagnosis of diseases caused by *Acanthamoeba* (Lorenzo-Morales *et al.* 2011). Consequently proteomic studies of this protozoan are essential for the identification and possible characterization of proteins that may aid in the immunodiagnosis.

Many studies, have revealed a diversity/repertoire of proteins expressed in several protozoa as *Acanthamoeba polyphaga* (Caumo *et al.* 2014), *Entamoeba histolytica* (Tolstrup *et al.* 2007; Biller *et al.* 2009; Ali *et al.* 2012), *Giardia lamblia* (Jerlstrom-Hultqvist *et al.* 2012; Faso *et al.* 2013), *Leishmania donovani* (Pawar *et al.* 2012), *Plasmodium falciparum* (Reamtong *et al.* 2015), *Trypanosoma* spp. (Cordero *et al.* 2009; Wagner *et al.* 2013). These studies are helping to understand the molecular mechanisms of interactions with host species, pathogenesis and pathophysiology, molecular mechanisms associated with the disease and to identify potential biomarkers for diagnosis and targets for therapeutic interventions (Khan, 2006; Siddiqui and Khan, 2012; Caumo *et al.* 2014; Lorenzo-Morales *et al.* 2015).

Studies in *Acanthamoeba castellanii* involving the investigation of protein expression during encystment (Bouyer *et al.* 2009; Leitsch *et al.* 2010), and a comprehensive analysis of proteins expressed by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites (Caumo *et al.* 2014), can help the elucidation of virulence mechanisms and the identification of diagnostic antigens and target proteins for therapy (Siddiqui and Khan, 2012; Lorenzo-Morales *et al.* 2015, Sánchez. *et al.* 2016). It was identified, that *Acanthamoeba castellanii* binds to mannose containing glycoproteins on the corneal epithelium through the mannose binding protein on the amoebae surface (Yang *et al.* 1997; Hurt *et al.*, 2003a, 2003b). Another surface proteins and cellular events involving proteins governing adherence to the host cell, are not completely elucidated (Soto-Arredondo *et al.* 2014).

In this study, we report the first proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins and soluble proteins from trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. We analysed the repertoire of proteins expressed by trophozoites of

Acanthamoeba castellanii using LC-MS/MS of tryptic peptides from of SDS-PAGE. Overall, 503 proteins were identified, being 119 proteins from surface-enriched protein fraction, 308 proteins obtained from the soluble fraction and 76 proteins were identified in both fractions. Identified proteins were characterized in accordance with their functional classes, and their antigenic potential. Thus, this work provides the most complete repertoire of proteins expressed by *Acanthamoeba castellanii*, being possible the selection of potential targets which can be used in the immunodiagnostics, and to the understanding of this protozoan interaction with other microorganisms.

MATERIAL AND METHODS

***Acanthamoeba castellanii* strain and cultivation**

A. castellanii (ATCC 30010) trophozoites of the T4 genotype, were used in this study. This environmental isolate had its pathogenicity in animals previously demonstrated by Veríssimo et al. (2013). Trophozoites were maintained in axenic cultures with, peptone-yeast extract-glucose (PYG) medium, as previously described by Schuster (2002).

Cell protein extracts

Three identical and independent cultures (biological replicates) in the exponential growth phase (cultivation for a period of 6 days) were used for protein extraction. Two different protein extracts were prepared, a total extract, denominated soluble fraction (SF) and an extract enriched with surface proteins (SEP). For SEP, were used approximately 1×10^8 cells, which were obtained according to Cordero, *et al.* (2009). For SF were used approximately 1×10^7 cells, which were obtained according Becker-Finco *et al.* (2013) with some modifications. To these cells (SF), was added a solution of 40 mM Tris-HCl pH 7.4 supplemented with 1 mM of a cocktail of protease inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Louis) at a ratio of three times its volume. Then the homogenate was submitted to cell lysis by sonication (VC601 Sonic & Material Inc. sonicator) on ice with four pulses of 20 seconds with intervals of a minute between each pulse, the power was 20 Hz. Then 1% Triton X-100 was added and intensively homogenized for 30 seconds two times. The samples were then centrifuged at $14,000 \times g$ for 30 minutes at 4°C thereby obtaining an extract of soluble proteins in the supernatant which was stored at -80°C until use. Protein contents were measured using a BCA protein assay kit (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA).

SDS-PAGE and sample preparation for mass spectrometry

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 12% under reducing conditions was performed to assess the protein profile of each fraction (SEP and SF) and were then visualized by Coomassie brilliant blue staining (Laemmli, 1970). From the migration profile presented on the gel, protein bands were manually excised from Coomassie-stained SDS-PAGE gel and digested with trypsin (TrypsinGold, Mass Spectrometry Grade, Promega), totaling 30 plugs per protein fraction (Fig. 1). Gel plugs were treated with three washes of 200 μ l of 50% acetonitrile and 25 mM ammonium bicarbonate for 15 min each, followed by one wash with 200 μ l of acetonitrile 100%. After the washing procedures, gel plugs were dried by vacuum centrifugation and digested for 18–24 h at 37 °C using 1 μ g/trypsin for 50 μ g/protein diluted to 25 mM in NH_4HCO_3 . After tryptic digestion, peptides were extracted with two washes of 50 μ l 50% acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) for 1 h. Extracted peptides were dried and resuspended in 15 μ l of 0.1% TFA.

Mass spectrometry analyses

Peptides digested from excised fragments of SDS-PAGE were analyzed by on-line liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS/MS) using a Waters nanoACQUITY Ultra Performance LC system coupled to a Waters Micromass Q-TOF Micro or Q-TOF Ultima API mass spectrometer (Waters MS Technologies, UK). Analytical runs were performed in duplicate for each band excised (Fig. 1). The peptides were eluted from the reverse-phase column to the mass spectrometer at a flow rate of 200 nl/min with a 10-50% water/ACN 0.1% formic acid linear gradient over 40 min for peptides obtained from bands manually excised from SDS-PAGE stained with coomassie. Analyses were performed using the data-dependent acquisition (DDA) mode. For each MS spectrum, the three most intense multiple charged ions above the threshold (30 counts/s) were automatically selected for MS/MS fragmentation. The collision energies for peptide fragmentation were set using the charge state recognition files for +2, +3 and +4 peptide ions provided by MassLynx (Waters). MS/MS raw data were processed using Protein-Lynx Global Server 2.0 software (Waters), and peak lists were exported in the micromass (.pkl) format.

Database searching and bioinformatics analyses

For peptide identification, raw MS data files were processed using Mascot Distiller. The data were searched using MASCOT software 2.0 (<http://www.matrixscience.com>, Matrix Science) against a local database of protein sequences (14,974) constructed based on the *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC 30010) strain genome obtained from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) (Clarke *et al.* 2013).

The Mascot search parameters consisted of a maximum of one missed cleavage site, fixed carbamidomethyl alkylation of cysteines, variable oxidation of methionine, and a 0.1 mass unit tolerance on parent and fragment ions. The significance threshold was set at $p < 0.05$, and only peptides with individual ion scores above this significance threshold were considered for protein identification. The MS/MS spectra of protein identifications based on a single peptide and on

border-line scores were manually inspected for acceptance.

Gene ontology (GO) terms were applied to the identified proteins using Blast2GO (Götz *et al.* 2008) and also <http://amigo.geneontology.org/amigo>, where Blast and annotations were performed with default parameters. Blast2GO was also used to generate the pie charts of GO terms from molecular functions, biological processes and cellular components in level 2.

Antigenic peptides are determined using the method of Kolaskar and Tongaonkar (1990). To predict those segments from within a protein sequence that are likely to be antigenic by eliciting an antibody response we use as tool <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>.

RESULTS

Profile and identification of proteins soluble fraction and of surface enriched protein resolved on SDS-PAGE

In order to solve the proteins of *A. castellanii*, we performed SDS-PAGE of two protein extracts obtained, soluble fraction and fraction of surface enriched protein from amoebae trophozoites maintained in long-term *in vitro* culture in standard conditions. As technical controls, three independent extractions were prepared and subsequently resolved in SDS-PAGE as seen in figure 1.

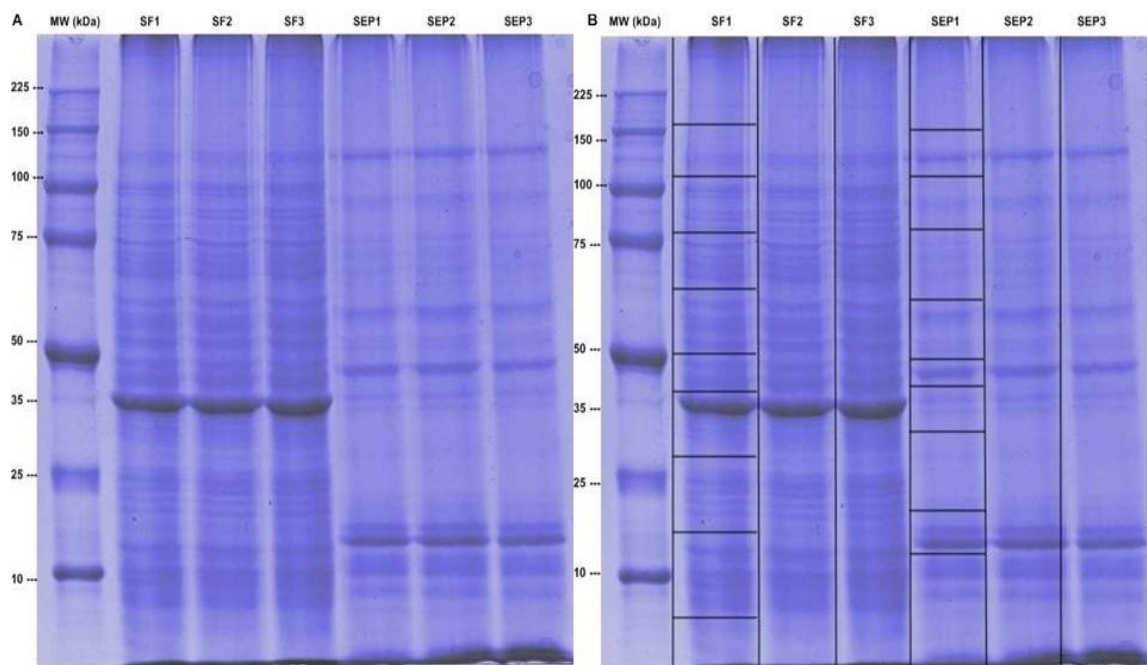


Fig. 1. Electrophoretic profiles of *Acanthamoeba castellanii* SF and SEP (fraction obtained by Triton X- 114) extraction. Thirty micrograms of protein from trophozoites were solved by SDS-PAGE 12% and stained with Coomassie Brilliant Blue G. Molecular mass markers are shown on the left. (A) Each column shown on the SDS-PAGE gel represents an independent extraction. SF: soluble fraction. SEP: fraction of surface enriched protein. (B) The details in the columns show the bands that were excised and treated for analysis in the mass spectrometer. All columns (six to total) were analyzed, totaling 60 samples and 120 runs in the mass spectrometer.

A. castellanii trophozoite protein extracts solved by SDS-PAGE were submitted to ESI-Q-TOF MS/MS analysis for protein identification. MS allowed a total of 503 different proteins identified. A total of 308 proteins were identified exclusively in the SF, 119 proteins exclusively in SEP and 76 proteins were identified in both fractions (SF and also in SEP) (Table 1 and Figure 2 - Venn

diagram) and (Supplementary Table S1, S2 and S3). This is the largest proteomic data set of an *Acanthamoeba* species obtained to date.

Table 1. Proteins identified (the ten with greater MASCOT score) from trophozoites of *A. castellanii* by LC/MS–MS.

Fraction	Protein	Mascot score ^a	Sequence coverage (%)
SF	hypothetical protein ACA1_198710	3424	29.2
SF	heat shock protein ssa1, putative	3253	21.9
SF	elongation factor 1alpha, somatic form, putative, partial	3004	22.6
SF	hypothetical protein ACA1_084830	2457	38.4
SF	hypothetical protein ACA1_084900	2261	32.9
SF	ATP:L-methionine S-Adenosyltransferase	2136	13.7
SF	Enolase, Cterminal TIM barrel domain containing protein	2112	28.7
SF	coronin3, putative	1661	16.1
SF	GDPassociated inhibitor, putative	1343	13.9
SF	hypothetical protein ACA1_143290	1339	27.9
SEP	START domain containing protein	5515	39.8
SEP	actin subfamily protein	3978	14.1
SEP	glycosomal membrane protein	2040	19.2
SEP	C8 sterol isomerase	1115	13.4
SEP	Oxysterolbinding protein 9, putative	943	17
SEP	serpin, putative	612	10.2
SEP	prohibitin PHB1, putative	508	41.3
SEP	GTPase-activator protein for Ras family GTPase	463	9.2
SEP	hypothetical protein ACA1_037930	463	23.7
SEP	small Gprotein	412	31
CP	Actin1	83978	62.4
CP	Actin subfamily protein	49055	49.8
CP	eukaryotic porin protein	18911	15.7
CP	actin subfamily protein	10968	15.8
CP	actin, putative	9655	5.1
CP	Actin1, putative	7994	11.4
CP	high molecular weight heat shock protein	5068	23.1
CP	ras-related protein Rab-2A, putative	4324	63
CP	VATPase subunit A, putative	3927	33.2
CP	CMF receptor CMFR1, putative	3803	19.4

SF: Soluble fraction. SEP: enriched extract with surface proteins. CP: Common proteins (proteins identified in SF and SEP).

^a Mascot score is $-10 \times \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Peptide scores > 25 for *Acanthamoeba castellanii* database, indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).



Fig. 2. Venn diagram showing the distribution of proteins in different protein extracts. Venn diagram identifying the total number of common and exclusive of proteins identified. SF: Soluble Fraction. SEP: Surface-enriched Protein. CP: Common Proteins (proteins identified in both fractions).

Functional analysis of the identified proteins

The functional annotation of the proteins identified in protein extracts from *A. castellanii* trophozoites was based on GO terms. In this analysis, ≥ 1 GO terms were assigned for all 503 proteins identified by ESI-Q-TOF MS/MS this study. The assigned GO terms for molecular function for these three sets of proteins are summarized in figure 3 and figure 4, and are listed in Supplementary Tables S1, S2 and S3.

Regarding biological process, all proteins identified in the three sets were grouped into eleven GO categories. Localization (GO:0051179), cellular component organization or biogenesis (GO:0071840), signaling (GO:0023052), cellular process (GO:0009987), single-organism process (GO:0044699), metabolic process (GO:0008152), biological regulation (GO:0065007), response to stimulus (GO:0050896), positive regulation of biological process (GO:0048518), negative regulation of biological process (GO:0048519) and regulation of biological process (GO:0050789). As examples of proteins that were identified in our study and which are related to biological process we can cite Ras subfamily, Rho family GTPase, GTPbinding, profilin II putative, VATPase subunit A, cytosolic regulator of adenylate cyclase, ATP synthase, ADPriboseylation factor 1 putative, copper/zinc superoxide dismutase, aspartic proteinase, eukaryotic translation elongation factor 2, alcohol dehydrogenase, prohibitin 2, ubiquitin domain containing protein, actin related protein 2/3 complex and response regulator receiver domain containing

protein.

As for GO categories associated with the cellular component they are extracellular region part (GO:0044421), membrane part (GO:0044425), organelle part (GO:0044422), cell part (GO:0044464), membrane-enclosed lumen (GO:0031974), cell (GO:0005623), extracellular region (GO:0005576), organelle (GO:0043226), macromolecular complex (GO:0032991) and membrane (GO:0016020) totalizing ten categories. Proteins such as coatomer subunit gamma, autophagy-related protein 27 protein, clathrin heavy chain putative, succinate dehydrogenase, adenine nucleotide translocator, actin, myosin, response regulator receiver and domain containing protein have been identified and are related to cellular components.

Finally, the proteins were classified into four groups of molecular-function: transporter activity (GO:0005215), catalytic activity (GO:0003824), binding (GO:0005488) and structural molecule activity (GO:0005198), where proteins have been identified as H(+) transporting atpase family protein, eukaryotic porin protein, dynamin domain containing protein, start domain containing protein, ribosomal protein S15 putative and 60S ribosomal protein putative.

The number of antigenic determinants realized showed that all proteins identified in this study present antigenic determinants, but more detailed studies should be conducted to investigate the real potential antigenic of each identified proteins (Table 2).

Table 2. Top 5 proteins with the highest number of antigenic peptides identified in this study.

Fraction	Protein	Number of antigenic determinants
SF	Fatty acid synthase complex protein	165
SF	AMP-dependent synthetase and ligase	150
SF	hypothetical protein ACA1_275620	114
SF	protein kinase domain containing protein	104
SF	leucine rich repeat domain containing protein	91
SEP	ubiquitin interaction motif domain containing protein	111
SEP	PremRNA processing splicing factor 8, putative	89
SEP	serine/threonineprotein kinase	83
SEP	protein kinase domain containing protein	80
SEP	tetratricopeptide repeat domain containing protein	76
CP	ubiquitin domain containing protein	84
CP	clathrin heavy chain, putative	83
CP	cullinassociated and neddylation-dissociated 1, putative	42
CP	hypothetical protein ACA1_246500	42
CP	importin beta subunit	34

SF: Soluble fraction. SEP: enriched extract with surface proteins. CP: Common proteins (proteins identified in SF and SEP).

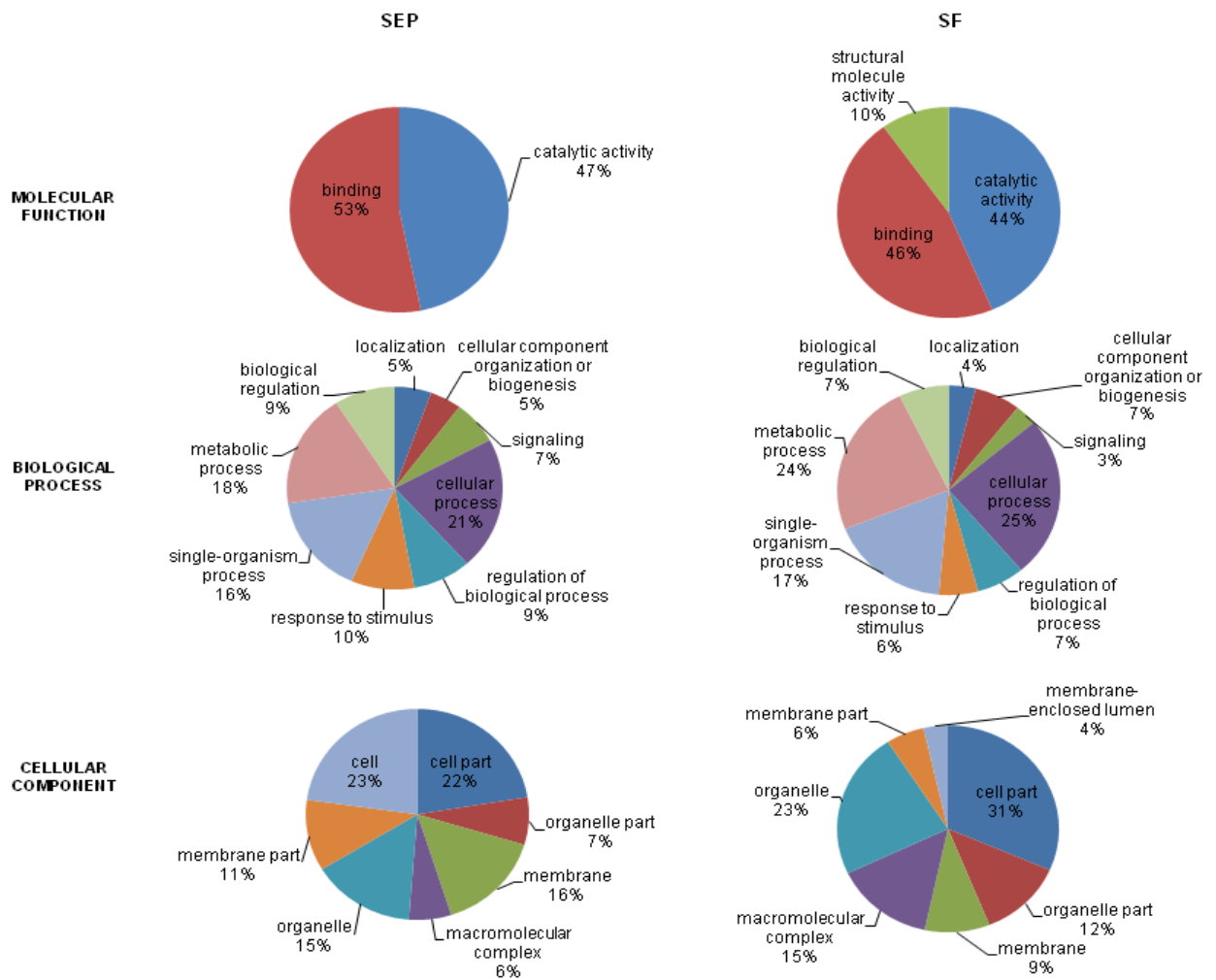


Fig 3. Functional analysis of proteins identified from *A. castellanii* trophozoites. The functional annotation of the proteins was based on Gene Ontology. Proteins were annotated according to biological processes, molecular functions and cellular components (level 2), using the Blast2GO tool. The distribution of the proteins in each category is indicated in the sectors of the circle. SEP (extract enriched with surface proteins) and SF (soluble fraction).

COMMON PROTEINS

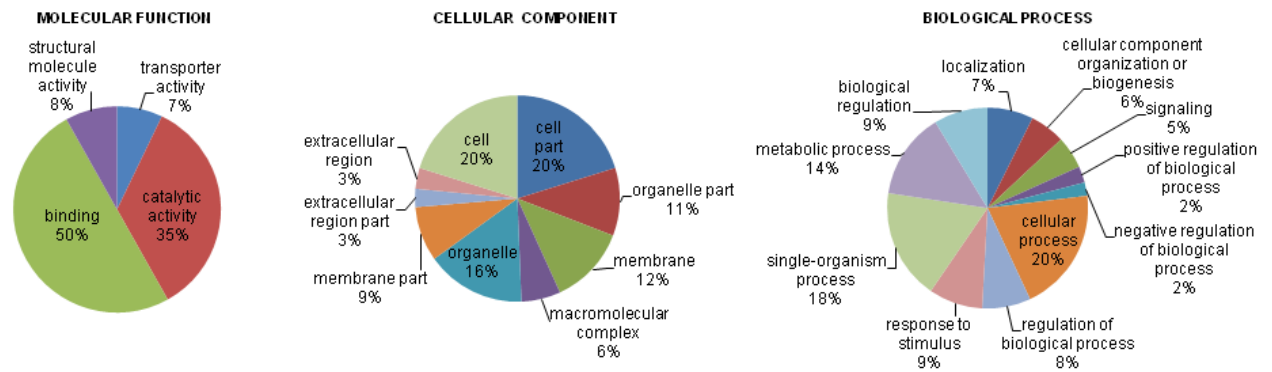


Fig 4. Functional analysis of proteins identified from *A. castellanii* trophozoites. The functional annotation of the proteins was based on Gene Ontology. Proteins were annotated according to biological processes, molecular functions and cellular components (level 2), using the Blast2GO tool. The distribution of the proteins in each category is indicated in the sectors of the circle.

DISCUSSION

Acanthamoeba trophozoites infect a variety of mammalian hosts and cause infections in humans, as a result of complex interactions between the pathogen-host, influence of environmental factors and also the immune status of the host (Siddiqui and Khan, 2012; Visvesvara, 2013). Much of the damage caused by *Acanthamoeba* spp. in pathological processes involves numerous different pathogenic mechanisms which so far are not understood (Lorenzo-Morales *et al.* 2015). The understanding of these mechanisms depends on the identification of proteins involved in the pathogen-host inter-play and requires that many studies proteomic are performed (Wagner *et al.* 2013; Beltran *et al.* 2017). Furthermore proteomic study allows an advance in the diagnosis of disorders caused by this amoeba (Ricciardi and Ndao, 2015).

Clarke *et al.* (2013) reported the genome of *A. castellanii* thereby enabling, together with mass-spectrometry techniques and protein identification software that proteomic studies enabling the understanding at the molecular level of the role of each protein and its potential in both pathogenesis and immunodiagnostic. Several proteomic studies have been performed in various protozoa characterizing and identifying proteins (Ali *et al.* 2012; Biller *et al.* 2014; Beltran *et al.* 2017). In this study we were able to identify numerous proteins directly related to the pathophysiological process caused by *Acanthamoeba*.

Proteins as actin, actin subfamily protein, actin-binding protein, tubulin, calponin, profilin, factin-capping protein, coronin and myosin are proteins identified in our study and are wich belong to the cytoskeleton (Caumo *et al.* 2014; Lorenzo-Morales *et al.* 2015). The first step in the pathogenesis of *Acanthamoeba* is the ability of amoebae to bind to the epithelium (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). *Acanthamoeba* trophozoites have multiple membrane projections called acanthopodia, which are primarily composed of fibres and bundles of actin (González-Robles *et al.* 2008). The physiology of these structures is related to the adhesion process and the cytopathic effect, indicating the importance of the cytoskeleton in the establishment and spread of infection (Soto-Arredondo *et al.* 2014). Cell projection was identified as a process that is involved in the pathogenesis of AK and AGE (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Soto-Arredondo

et al. 2014).

The cytoskeleton is essential to all eukaryotic cells, participating directly in structural roles, assembly of actin into filaments powers diverse cellular processes, including cell motility and endocytosis (Bosch and Siderovski, 2013; Zysset-Burri *et al.* 2014). Many biological processes, such morphological transformation and the pathogen–host interactions require remodeling of the cytoskeleton in response to intracellular and extracellular signals (González-Robles *et al.* 2008; Caumo *et al.* 2014). It was previously demonstrated by Veríssimo *et al.* (2013) that this isolate of *Acanthamoeba castellanii* (ATTCC 30010), while maintained in culture, as used here, were able to establish systemic infections in the rats.

Proteins as adp-ribosylation factor 1, clathrin heavy chain, rasrelated protein rab-2b, ras-related protein rab-2a, putative, ankyrin domain protein, coatomer and clathrin heavy chain identified in the study generally associate with cell membranes and regulate vesicular traffic/vesicle-mediated transport and intracellular signalling (Serbzhinskiy, *et al.* 2015). The second important element involved in adhesion is the number of acanthopodia on the amoebic surface, once attached, intracellular signaling processes trigger the pathogenic cascade involved in the pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis (Lorenzo-Morales *et al.* 2015). Rab proteins are ubiquitous small gtp-binding proteins that form a highly conserved family and regulate vesicular traffcking (Law *et al.* 2017; Frei *et al.* 2006). Proteins rab present the dynamism of the membrane transport and the committed reliance that these proteins in the determination of specificity of vesicular trafficking in unicellular protozoan parasite (Saito-Nakano *et al.* 2005).

Another protein potentially important in the infection process is eukaryotic porin protein, present in membranes and various internal organelles of cells which has been assigned several biological functions, such as transmission of external information, movement of nutrients and waste products, transfer of energy across membranes (Behera and Satpathy, 2016; Blachly-Dyson and Forte, 2001). In characterise and analyze the expression pattern of proteins of infective trophozoite and cyst forms of *Acanthamoeba* spp. isolated from an amoebic keratitis patient, Behera and Satpathy (2016) identified the presence of eukaryotic porin protein. Potentially this protein may be involved in pathological processes caused by *Acanthamoeba*.

The identification of proteins from the surface-enriched protein fraction possibilities for future studies on the pathogenesis, virulence factors, immunogenic potential and drug interaction in *A. castellanii* and other species. Proteins as gdp-mannosepyrophosphorylase, lim domain protein, leucine rich repeat domain containing protein, vtype atpase, are proteins of membrane and showing antigenic determinants. Studies have identified these proteins of surface in *E. histolytica*, calreticulin, LIM and Rab proteins have helped to elucidate mechanisms of virulence (Bosch and Siderovski, 2013; Biller *et al.* 2014; Hanadate *et al.* 2016). C2 domain protein kinase, protein also identified in our study initiates phagocytosis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*, in *Acanthamoeba* it has an essential role in survival and pathogenesis (Somlata *et al.*, 2011). It has been observed that *Acanthamoeba* phagocytose and/or engulfs corneal epithelial cells and that this activity is mediated via amoebastomes present on the surface of amoebae (Khan, 2001).

ATPases proteins were identified these studies, ATPases are glycoproteins expressed in the plasma membranes with their active sites facing the external medium. ATPases hydrolyze extracellular ATP and other nucleoside triphosphates (Sissons *et al.* 2004; Lorenzo-Morales *et al.* 2015). The resultant ADP can have toxic effects on the host cells (Lorenzo-Morales *et al.* 2015). Studies have shown that ATPase plays an important role in the phagocytosis process and coupled transport of small molecules carried out by the protozoan *Entamoeba histolytica* (Meléndez-Hernández *et al.* 2008).

Two superoxide dismutases have been identified in *Acanthamoeba* these study: an iron superoxide dismutase and a copper-zinc superoxide dismutase. They may be potential virulence factors of *Acanthamoeba* by acting both as anti-oxidants and anti-inflammatory agents (Choi *et al.* 2000; Lorenzo-Morales *et al.* 2015). *A. castellanii* iron superoxide dismutase may play essential roles in the survival of amoebae not only by protecting themselves from endogenous oxidative stress, but also by detoxifying oxidative killing of amoebae by host immune effector cells (Kim *et al.* 2012). They may also provide additional targets for chemotherapy and immuno-diagnosis of *Acanthamoeba* infections (Lorenzo-Morales *et al.* 2015). *E. histolytica* trophozoites live in an anaerobic or microaerobic environment in the large intestine where they are exposed to a low

concentration of oxidants from the metabolism of themselves (Jeelani and Nozaki, 2016). However, once trophozoites invade the tissues, they must survive both a high oxygen environment attributable to circulation and exposure to the oxidative burst from primary protective host immune cells including neutrophils and macrophages (Anaya-Velazquez and Padilla-Vaca 1991; Jeelani and Nozaki, 2016). *E. histolytica* lacks most of the typical components of the eukaryotic oxidative stress defense systems including catalase, peroxidase and iron superoxide dismutase (Fe-SOD) (Jeelani and Nozaki, 2016). Thus, proteins related to oxidative stress may be directly related to the pathophysiology of AK and EAG. All the proteins mentioned were identified in this study.

The study carried by Bouyer, *et al.* (2009) performed with two-dimensional gel electrophoresis to compare protein expression in trophozoite and cyst forms of *A. castellanii*. Three of the proteins were specifically expressed in the thophozoite form as actophorin, ribosomal protein S12 and elongation. Others three proteins were specifically expressed in the cyst form, of these, heat shock protein 70 and gelation factor and enolase. All the mentioned proteins were identified in our study.

Proteins as HSP70, HSP90, HSP91 related to protein turnover and other proteins with chaperone activity, proteasome, ubiquitin and chaperone Dnak were identified in this study and also observed by Caumo, *et al.* (2014). Heat shock proteins are considered to be inducible protective proteins that are critical for pathogen survival, as well as immune-reactive proteins that are important in parasitic infection (Wang *et al.* 2009; Caumo *et al.* 2014). Heat shock protein 90 alpha and heat shock protein gp96 are directly related with response to stress. In study performed by Singh *et al.* (2015), observed also that heat shock protein 90 regulates encystation in *Entamoeba*. Cytosolic heat shock protein 90 has been shown to be essential for many infectious pathogens and is considered a potential target for drug development (Singh *et al.* 2014).

Caumo, *et al.* (2014) performed a comprehensive analysis of the proteins expressed by *A. polyphaga* trophozoites based on complementary 2-DE MS/MS and gel-free LC-MS/MS approaches identifying 202 proteins. One hundred and one of the 202 proteins were also found in our proteomic analysis of *A. castellanii* trophozoites, showing the genetic similarity among *Acanthamoeba* species. Among the identified proteins by Caumo, *et al.* (2014) and this study, calreticulin

that presents 11 antigenic determinants, is a protein that can potentially interact with host receptors and signaling machinery was also found to be immuno-reactive in other works (Wang, *et al.* 2009). Sánchez, *et al.* (2016) showed that calreticulin is a protein potential for *A. castellanii* infection immunodiagnosis in human infections.

Proteins related to various metabolic processes also were identified, phosphoglycerate kinase, triosephosphate isomerase, glucose-6-phosphate isomerase, citrate synthase, elongation factor 1 alpha, malate dehydrogenase, 60S ribosomal protein and transketolase that are involved in processes such as glycolytic process and metabolic processes typically transform small molecules, but also include macromolecular processes such as DNA repair and replication, and protein synthesis and degradation (Clarke *et al.* 2013; Caumo *et al.* 2014; Lorenzo-Morales *et al.* 2015; Moon *et al.* 2016; Alves *et al.* 2017). Many of these proteins are directly related to the vegetative form of the parasite and consequently are involved in processes of cell division, obtaining energy, motility and thus migration in a host. Proteins as ribosomal L40e family, serine/threonine kinase, hypothetical protein ACA1_306820, fatty acid synthase complex protein and RasGEF domain containing identified in our study, were also characterized in the proteomic study conducted by Huang *et al.* (2016), where this author used clinical isolates of *Acanthamoeba*.

The GO classification carried out to functionally annotate the proteins identified here resulted in data comparable especially with the work done by Caumo *et al.* (2014), and too to those reference proteomes of other pathogens. In our study most of the proteins were assigned to the classes of biological process (11 GO categories) and cell components (10 GO categories). Regarding molecular function four GO categories were observed. In the study performed by Caumo, *et al.* (2014) biological process (14 GO categories) and molecular function (9 GO categories) were the main observed classes. This predominance of proteins involved in biological processes may be a consequence of the vegetative growth and increased cellular activity exhibited by the *Acanthamoeba* active trophozoite stage.

Our proteomic analyses surveyed, for the first time, the repertoire considerable of proteins expressed by *A. castellanii* trophozoite. This proteome study of *Acanthamoeba castellanii* will be a useful reference for immunological studies aiming toward the identification of antigenic proteins and development of new drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas (Uniprote-MS) at the Centro de Biotecnologia(Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil) and the Mass Spectrometry Laboratory at the Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), CNPEM, Campinas, Brazil, for their support with the mass spectrometry analyses (project MAS 18253). This study was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Project 449154/2014-9).

REFERENCES

- Ali, I.K., Haque, R., Siddique, A., Kabir, M., Sherman, N.E., Gray, S.A., Cangelosi, G.A., Petri, W.A.** (2012). Proteomic analysis of the cyst stage of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6** (5) 1643.
- Alves, D. D. S. M. M., Alves, L. M., da Costa, T. L., de Castro, A. M., & Vinaud, M. C.** (2017). Anaerobic Metabolism in T4 *Acanthamoeba* Genotype. *Current Microbiology*, **74**(6), 685-690.
- Anaya-Velazquez, F., Padilla-Vaca, F.** (1991). Effect of intestinal bacteria on the virulence of *Entamoeba histolytica*. *Archives of medical research*, **23** (2), 183-185.
- Baig, A. M.** (2015). Pathogenesis of amoebic encephalitis: are the amoebae being credited to an 'inside job' done by the host immune response? *Acta Tropica* **148**, 72–76.
- 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.** (2013). Physiological, morphological, and immunochemical parameters used for the characterization of clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*. *Parasitology*, **140** (03), 396-405.
- Behera, H. S., Satpathy, G.** (2016). Characterisation and expression analysis of trophozoite and cyst proteins of *Acanthamoeba* spp. isolated from *Acanthamoeba* keratitis (AK) patient. *Molecular and biochemical parasitology*, **205**(1), 29-34.
- Beltran, P. M. J., Federspiel, J. D., Sheng, X., & Cristea, I. M.** (2017). Proteomics and integrative omic approaches for understanding host–pathogen interactions and infectious diseases. *Molecular systems biology*, **13** (3), 922.
- Biller, L., Schmidt, H., Krause, E., Gelhaus, C., Matthiesen, J., Handal, G., Lotter, H., Janssen, O., Tannich, E., Bruchhaus, I.** (2009). Comparison of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. *Proteomics* **9**, 4107–4120.
- Biller, L., Matthiesen, J., Kuhne, V., Lotter, H., Handal, G., Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Schumann, M., Roeder, T., Tannich, E., Krause, E., Bruchhaus, I.** (2014). The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 132–144.
- Blachly-Dyson, E., & Forte, M.** (2001). VDAC channels. *IUBMB life*, **52**(3-5), 113-118.

Bosch, D. E., & Siderovski, D. P. (2013). G protein signaling in the parasite *Entamoeba histolytica*. *Experimental & molecular medicine*, **45**(3), e15.

Bouheraoua, N., Gaujoux, T., Goldschmidt, P., Chaumeil, C., Laroche, L. and Borderie, V.M. (2013). Prognostic factors associated with the need for surgical treatments in *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* **32**, 130–136

Bouyer, S., Rodier, M.H., Guillot, A., Héchard, Y. (2009). *Acanthamoeba castellanii*: proteins involved in actin dynamics, glycolysis, and proteolysis are regulated during encystation. *Exp. Parasitol.* **123**, 90–94.

Caumo, K. S., Monteiro, K. M., Ott, T. R., Maschio, V. J., Wagner, G., Ferreira, H. B., & Rott, M. B. (2014). Proteomic profiling of the infective trophozoite stage of *Acanthamoeba polyphaga*. *Acta tropica*, **140**, 166-172.

Choi, D. H., Na, B. K., Seo, M. S., Song, H. R., & Song, C. Y. (2000). Purification and characterization of iron superoxide dismutase and copper–zinc superoxide dismutase from *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Parasitology*, **86**(5), 899-907.

Clarke, M., Lohan, A. J., Liu, B., Lagkouvardos, I., Roy, S., Zafar, N., Bertelli, C., Schilde, C., Kianianmomeni, A., Bürglin, T. R., Frech, C., Turcotte, B., Kopec, K. O., Synnott, J. M., Choo, C., Paponov, I., Finkler, A., Heng Tan, C. S., Hutchins, A. P., Weinmeier, T., Rattei, T., Chu, J. S., Gimenez, G., Irimia, M., Rigden, D. J., Fitzpatrick, D. A., Lorenzo-Morales, J., Bateman, A., Chiu, C. H., Tang, P. (2013). Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biology* **14**, R11.

Cordero, E.M., Nakayasu, E.S., Gentil, L.G., Yoshida, N., Almeida, I.C., da Silveira, J.F. (2009) Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Proteome Res.* **8**, 3642–52.

Corsaro, D., Walochnik, J., Köhsler, M. and Rott, M.B. (2015). *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitology Research* **114**, 2481–2490.

Faso, C., Bischof, S., Hehl, A.B. (2013). The proteome landscape of *Giardia lamblia* encystation. *PLoS One.* **8**, 83207.

Frei, S. B., Rahl, P. B., Nussbaum, M., Briggs, B. J., Calero, M., Janeczko, S., Collins, R. N. (2006). Bioinformatic and comparative localization of Rab proteins reveals functional insights into the uncharacterized GTPases Ypt10p and Ypt11p. *Molecular and cellular biology*, **26**(19), 7299-7317.

Gonzalez-Robles, A., Castanon, G., Hernandez-Ramirez, V.I., Salazar-Villatoro, L., Gonzalez-Lazaro, M., Omana-Molina, M., Talamas-Rohana, P., Martinez-Palomo, A. (2008). *Acanthamoeba castellanii*: identification and distribution of actin cytoskeleton. *Exp. Parasitol.* **119**, 411–417.

Götz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Williams, T.D., Nagaraj, S.H., Nueda, M.J., Robles, M., Talon, M., Dopazo, J., Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* (England) **36**(10), 3420–3435.

Greub G, Raoult D. (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews* **17**:413-433.

Guimaraes, A. J., Gomes, K. X., Cortines, J. R., Peralta, J. M., & Peralta, R. H. S. (2016). *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. *Microbiological Research*, **193**, 30-38.

Hanadate, Y., Saito-Nakano, Y., Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2016). Endoplasmic reticulum-resident Rab8A GTPase is involved in phagocytosis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cellular microbiology*, **18**(10), 1358-1373.

Hurt, M., Neelam, S., Niederkorn, J., Alizadeh, H. (2003a). Pathogenic *Acanthamoeba* spp. secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. *Infect. Immun.* **71**, 6243-6255.

Hurt, M., Niederkorn, J., Alizadeh, H. (2003b). Effects of mannose on *Acanthamoeba castellanii* proliferation and cytolytic ability to corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 3424-3431.

Jeelani, G., Nozaki, T. (2016). *Entamoeba* thiol-based redox metabolism: a potential target for drug development. *Molecular and biochemical parasitology*, **206**(1), 39-45.

Jerlstrom-Hultqvist, J., Stadelmann, B., Birkestedt, S., Hellman, U., Svard, S.G. (2012). Plasmid vectors for proteomic analyses in *Giardia*: purification of virulence factors and analysis of the proteasome. *Eukaryotic cell*, **11**(7), 864-873.

Khan, N. A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews* **30**, 564–595.

Kim, J. Y., Na, B. K., Song, K. J., Park, M. H., Park, Y. K., & Kim, T. S. (2012). Functional expression and characterization of an iron-containing superoxide dismutase of *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitology research*, **111**(4), 1673-1682.

Kolaskar, A. S., Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters*, **276** (1-2), 172-174.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–5.

Lakhundi, S., Siddiqui, R., Khan, N. A. (2016). Pathogenesis of microbial keratitis. *Microbial Pathogenesis*. DOI: 10.1016/j.micpath.

Law, F., Seo, J. H., Wang, Z., DeLeon, J. L., Bolis, Y., Brown, A., Wei-Xing Zong, Guangwei Du, Rocheleau, C. E. (2017). The VPS-34 PI3 kinase negatively regulates RAB-5 during endosome maturation. *J Cell Sci*, jcs-194746.

Leitsch, D., Köhler, M., Marchetti-Deschmann, M., Deutsch, A., Allmaier, G., Duchêne, M., & Walochnik, J. (2010). Major role for cysteine proteases during the early phase of *Acanthamoeba castellanii* encystment. *Eukaryotic cell*, **9**(4), 611-618.

Lorenzo-Morales, J., Morcillo-Laiz, R., Martín-Navarro, C. M., López-Vélez, R., López-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Martínez-Carretero, E. (2011). *Acanthamoeba keratitis* due to genotype T11 in a rigid gas permeable contact lens wearer in Spain. *Contact Lens and Anterior Eye*, **34**(2), 83-86.

Lorenzo-Morales, J., Khan, N. A. and Walochnik, J. (2015). An update on *Acanthamoeba keratitis*: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite* **22**, 10.

Marciano-Cabral, F., and Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 273–307.

Meléndez-Hernández, M. G., Barrios, M. L. L., Orozco, E., & Luna-Arias, J. P. (2008). The Vacuolar ATPase from *Entamoeba histolytica*: Molecular cloning of the gene encoding for the B subunit and subcellular localization of the protein. *BMC microbiology*, **8**(1), 235.

Moon, E. K., Hong, Y., Chung, D. I., Goo, Y. K., Kong, H. H. (2016). Identification of Protein Arginine Methyltransferase 5 as a Regulator for Encystation of *Acanthamoeba*. *The Korean journal of parasitology*, **54**(2), 133.

Pawar, H., Sahasrabudhe, N. A., Renuse, S., Keerthikumar, S., Sharma, J., Kumar, G., Nemade, H. (2012). A proteogenomic approach to map the proteome of an unsequenced pathogen—*Leishmania donovani*. *Proteomics*, **12** (6), 832-844.

Ricciardi, A. and Ndao, M. (2015). Diagnosis of parasitic infections: what's going on? *Journal of Biomolecular Screening* **20**, 6–21.

Reamtong, O., Srimuang, K., Saralamba, N., Sangvanich, P., Day, N. P., White, N. J., & Imwong, M. (2015). Protein profiling of mefloquine resistant *Plasmodium falciparum* using mass spectrometry-based proteomics. *International journal of mass spectrometry*, **391**, 82-92.

Saito-Nakano Y, Loftus BJ, Hall N, Nozaki T. (2005).The diversity of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol.*; **110**(3):244–52. pmid:15955319.

Sánchez, A.G.C., Virginio, V.G., Maschio, V.J., Ferreira, H.B., Rott, M.B. (2016). Evaluation of the immunodiagnostic potential of a recombinant surface protein domain from *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitology*, **1-9**.

Schuster, F. L. (2002). Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebas. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 342–354.

Siddiqui, R., and Khan, N.A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit.Vectors* **5**, 6.

Siddiqui, R., Khan, N.A. (2012). War of the microbial worlds: who is the beneficiary in *Acanthamoeba* bacterial interactions? *Exp. Parasitol.* **130**, 311–313.

Siddiqui, R., Khan, N.A. (2012). *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: a myth or reality? *Exp. Parasitol.* **130**, 95–97.

Singh, M., Shah, V., & Tatu, U. (2014). A novel C-terminal homologue of Aha1 co-chaperone binds to heat shock protein 90 and stimulates its ATPase activity in *Entamoeba histolytica*. *Journal of molecular biology*, **426**(8), 1786-1798.

Singh M., Sharma S., Bhattacharya A., Tatu U. (2015). Heat shock protein 90 regulates encystation in *entamoeba*. *Frontiers in microbiology.*; **6**:1125.

Sissons, J., Alsam, S., Jayasekera, S., & Khan, N. A. (2004). Ecto-ATPases of clinical and non-clinical isolates of *Acanthamoeba*. *Microbial pathogenesis*, **37**(5), 231-239.

Somlata, Bhattacharya S, Bhattacharya A. (2011). A C2 domain protein kinase initiates phagocytosis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Nat Commun* **2**:230.10.1038/ncomms1199.

Soto-Arredondo, K. J., Flores-Villavicencio, L. L., Serrano-Luna, J. J., Shibayama, M. and Sabanero-López, M. (2014). Biochemical and cellular mechanisms regulating *Acanthamoeba castellanii* adherence to host cells. *Parasitology*. **141**, 531–541.

Tolstrup, J., Krause, E., Tannich, E., and Bruchhaus, I. (2007). Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology* **134**, 289–298.

Veríssimo, C.M., Maschio, V.J., Correa, A.P., Brandelli, A., Rott, M.B. (2013). Infection in a rat model reactivates attenuated virulence after long-term axenic culture of *Acanthamoeba* spp. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **108** (7), 832–835.

Visvesvara, G. S. (2013). Infections with free-living amoebae. *Handbook of Clinical Neurology* **114**, 153–168.

Visvesvara, G.S., Moura, H., and Schuster, F.L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **50**, 1–26.

Wagner, G., Yamanaka, L.E., Moura, H., Lückemeyer, D.D., Schlindwein, A.D., Stoco, P. H., Ferreira, H.B., Barr, J.R., Steindel, M., Grisard, E. C. (2013). The *Trypanosoma rangeli* trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis. *Journal of proteomics.* **82**, 52-63.

Wang, Y., Cheng, Z., Lu, X., & Tang, C. (2009). Echinococcus multilocularis: Proteomic analysis of the protoscoleces by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Experimental parasitology*, **123** (2), 162-167.

Yang, Z., Cao, Z. and Panjwani, N. (1997). Pathogenesis of *Acanthamoeba keratitis*: carbohydrate-mediated host-parasite interactions. *Infection and Immunity.* **65**, 439–445.

Zysset-Burri, D. C., Müller, N., Beuret, C., Heller, M., Schürch, N., Gottstein, B., & Wittwer, M. (2014). Genome-wide identification of pathogenicity factors of the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *BMC genomics*, **15** (1), 496.

CAPITULO II

Artigo intitulado “**Current Aspects Related to the Diagnosis of *Acanthamoeba* Infections - A BRIEF REVIEW**” artigo a ser submetido para o periódico a *Current Microbiology*.

CURRENT ASPECTS RELATED TO THE DIAGNOSIS OF *Acanthamoeba* INFECTIONS - A BRIEF REVIEW

VINICIUS JOSÉ MASCHIO¹, and MARILISE BRITTES ROTT^{1,2}

1 Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

2 Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Porto Alegre, Brazil. E-mail: marilise.rott@ufrgs.br

ABSTRACT

Acanthamoeba is an opportunistic protozoan and is well recognized to produce serious human infections, including acanthamoeba keratitis and a fatal encephalitis named Granulomatous Amoebic Encephalitis. This review presents current aspects related to the diagnosis of *Acanthamoeba* infections. Among all diagnostic procedures, corneal scraping, microscopy of biological material as cerebrospinal fluid and smear examination are essential diagnostic methods. Polymerase chain reaction is presenting as a sensitive and accurate detection method. Culturing remains the gold standard of *Acanthamoeba* laboratory diagnosis.

***Acanthamoeba* and human infections**

Acanthamoeba spp. is an opportunistic protist that is ubiquitously distributed in the environment (Siddiqui and Khan, 2012). The life cycle of *Acanthamoeba* consists of two stages: an actively feeding, dividing trophozoite that is recognized to be the infective stage and a dormant and extremely resistant cyst (Khan, 2006).

Diseases caused by *Acanthamoeba* spp. in humans include *Acanthamoeba* keratitis (AK), granulomatous amoebic encephalitis (GAE) and disseminated amoebic disease (Marciano-Cabral and Cabral, 2003).

AK is a rare sight threatening corneal infection and the main risk factors are contact lens wear for extended periods, corneal trauma, non-sterile contact lens rinsing, swimming while wearing contact lenses and biofilm formation on contact lens (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015). Clinical manifestations of AK include excruciating pain characterized by redness, epiphora, lacrimation, eyelid diptosis, conjunctival hyperemia, foreign body sensation and photophobia (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Lorenzo-Morales *et al.*, 2015). AK can be difficult to diagnose and treat, and is frequent the occurrence of secondary bacterial infections (Siddiqui and Khan, 2012).

GAE is a disease which is characterized by a chronic protracted slowly progressive central nervous system (CNS) infection (Baig, 2015). GAE is generally associated with individuals who already have underlying diseases such as malignancies, systemic lupus erythematosus, skin ulcers, human immunodeficiency virus (HIV) infection or Hodgkin's disease (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Siddiqui and Khan, 2012). The route of infection is thought to be by inhalation of amoebae through the nasal passages and lungs or introduction through skin lesions (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). Access to the CNS may be by hematogenous spread from a primary site in the lungs or skin or directly through the olfactory neuroepithelium (Visvesvara *et al.*, 2007). The clinical symptoms may resemble viral, bacterial or tuberculosis meningitis and include headache, confusion, nausea, vomiting, fever, lethargy, stiff neck, focal neurologic deficits, or signs of increased intracranial pressure (Siddiqui and Khan, 2012).

A complete understanding of the pathogenesis and pathophysiology of these infections will undoubtedly lead to the development of diagnostic advances and therapeutic interventions (Siddiqui et al., 2011; Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

Diagnostic of infections caused by *Acanthamoeba*

The diagnostic of infections caused by *Acanthamoeba* include direct microscopy of biological material as cerebrospinal fluid (CSF) or CSF sediment, corneal scrapings and methods for *in vitro* cultivation of *Acanthamoeba* also have been used for laboratory diagnosis. Computed tomography and magnetic resonance imaging have been performed on some patients (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Yuehua et al., 2014; Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

CSF, brain tissue, or material from cutaneous or sinus lesions and corneal scrapings can be inoculated into amoeba growth medium, onto nonnutrient agar (NNA) plates containing a layer of *Escherichia coli* or *Enterobacter aerogenes* cells, or onto monolayers of cultured mammalian cells (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Borin et al., 2013; Yuehua et al., 2014).

Depending on the density of amoebae, *Acanthamoeba* can be observed after 24 hours of inoculation (Rocha-Azevedo et al., 2009). Corneal biopsy has been suggested when repeated cultures of corneal scrapings are negative (Ficker et al. 1991; Yuehua et al., 2014). Corneal or conjunctival swabs are generally not suitable for isolation of *Acanthamoeba* (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). Histological diagnosis can be made on the basis of frozen or paraffin-embedded sections of brain or cutaneous lesion biopsy material stained (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Yuehua et al., 2014).

Immunofluorescent or immunoperoxidase cytochemical staining of cryostat sections or infected tissues embedded in paraffin, as well as transmission electron microscopy of infected tissues, has been employed for identification of *Acanthamoeba* with great success (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Yuehua et al., 2014).

Ocular infections with *Acanthamoeba* are many times difficult to diagnose because they can resemble those due to herpes simplex virus, *Pseudomonas aeruginosa*, or fungal infection. As a result, there is often a significant delay in

formulating an appropriate diagnosis before treatment is started (Siddiqui and Khan, 2012).

For cytological diagnosis, various staining methods can be employed. The indirect immunofluorescent-antibody assay has been used to detect amoebae in corneal scrapings or in biopsy tissue (Rocha-Azevedo et al., 2009). Calcofluor white, a chemo fluorescent dye with an affinity for the polysaccharide polymers of amebic cysts, has been used to identify amebic cysts in corneal tissue (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Rocha-Azevedo et al., 2009).

The diagnosis of AK can also be made by *in vivo* confocal microscopy (IVCM). The *Acanthamoeba* cysts appearing as hyper-reflective, spherical structures usually well defined because of their double wall, but the trophozoites are difficult to distinguish from leukocytes and keratocyte nuclei (Wincheste et al. 1995; Vaddavalli et al. 2011; Lorenzo-Morales et al. 2015). However, the direct detection of the causative agent in a corneal scrape specimen is a reliable diagnostic method for AK.

In addition to various staining methods, the usefulness of PCR for detection of *Acanthamoeba* has been demonstrated (Costa et al., 2017). Studies in which clinical isolates have been identified based on sequence types have shown that the majority of strains causing keratitis belong to genotype T4 (Siddiqui and Khan, 2012; Lorenzo-Morales et al., 2015).

Immunological techniques may be used to diagnose AK, but this technology is still not available and is found in developmental stages. The great problem is that due to ubiquity of this amoeba, more than 70% of healthy human being displayed anti-*Acanthamoeba* antibodies (Yuehua et al., 2014; Lorenzo-Morales et al., 2015).

Epstein et al. (1986) ever rapidly diagnosed two cases of *Acanthamoeba* keratitis which were misdiagnosis as herpes simplex keratitis by indirect immunofluorescent antibody staining. Sharma et al. (2001) describe a simple procedure of immunoperoxidase (IP) technique, using indigenously raised antibody, to screen corneal scrapings for *Acanthamoeba* cysts and trophozoites. The immunoperoxidase technique was a simple and useful test in the diagnosis of AK. In that study, the sensitivity and specificity were 100% and 94%, respectively. Immunoperoxidase technique is also efficient to detect *Acanthamoeba* in host

tissue. Cysts and trophozoites are easily detected by transmission electron microscopy. HSP70 a protein potentially involved in pathogen survival mechanisms was previously identified as an antigenic protein by 2DE immunoblot experiments using infected rat serum with *A. polyphaga* (Caumo et al. 2014).

Toriyama et al. (2015) developed an immunochromatographic assay kit that uses fluorescent silica nanoparticles bound to anti-*Acanthamoeba* antibodies (fluorescent immunochromatographic assay [FICGA]). Assays using this method with samples of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts diluted to various concentrations, shown high sensitivity for detection of *Acanthamoeba* and may be useful for the diagnosis of AK.

More recently, Sánchez et al. (2016) showed that calreticulin, a possible surface antigen, presented significant results in the use of this protein, being most recognized by sera from encephalitis of infected rats in comparison with the non-infected controls. These results showed the calreticulin as a potential for *A. castellanii* infection immunodiagnosis in animals, with further studies being required for assessment of its use for human infections.

CONCLUSIONS

The number of reported cases of *Acanthamoeba* keratitis is increasing worldwide every year and the clinical suspicion is the first and most vital step in managing diagnostic of infections caused by *Acanthamoeba*. Early diagnosis is very important to improve the prognosis. Culture remains the gold standard of *Acanthamoeba* laboratory diagnosis, but today several PCR-based techniques are also well established and usually increase sensitivity significantly. Immunological tools for diagnosis still stop in the ubiquity of the parasite, as the majority of the population of healthy human being displayed anti-*Acanthamoeba* antibodies.

REFERENCES

- Baig, Abdul Mannan. "Pathogenesis of amoebic encephalitis: Are the amoebae being credited to an 'inside job'done by the host immune response?" *Acta tropica* 148 (2015): 72-76.
- Borin, Samuel, et al. "Rapid diagnosis of acanthamoeba keratitis using non-nutrient agar with a lawn of *E. coli*." *Journal of ophthalmic inflammation and infection* 3.1 (2013): 40.
- Caumo, K. S., Monteiro, K. M., Ott, T. R., Maschio, V. J., Wagner, G., Ferreira, H. B., Rott, M. B. "Proteomic profiling of the infective trophozoite stage of *Acanthamoeba polyphaga*." *Acta tropica* 140 (2014): 166-172.
- Costa, A. O., Furst, C., Rocha, L. O., Cirelli, C., Cardoso, C. N., Neiva, F. S., Possamai C. O., de Assis Santos D., Thomaz-Soccol, V. "Molecular diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis: evaluation in rat model and application in suspected human cases." *Parasitology research* 116.4 (2017): 1339-1344.
- Epstein, Randy 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* 104.9 (1986): 1318-1321.
- Ficker, L., Kirkness, C., McCartney, A., & Seal, D. "Microbial keratitis—the false negative." *Eye* 5.5 (1991): 549-559.
- Khan, Naveed Ahmed. "Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health." *FEMS microbiology reviews* 30.4 (2006): 564-595.
- Lorenzo-Morales, Jacob, Naveed A. Khan, and Julia Walochnik. "An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment." *Parasite* 22 (2015): 10.
- Marciano-Cabral, Francine, and Guy Cabral. "*Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans." *Clinical microbiology reviews* 16.2 (2003): 273-307.
- Rocha-Azevedo, Bruno, Herbert B. Tanowitz, and Francine Marciano-Cabral. "Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae." *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases* 2009 (2009).

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* (2016): 1-9.

Sharma, S., Athmanathan, S., Garg, P., Rao, G. N. "Evaluation of immunoperoxidase staining technique in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis." *Indian journal of ophthalmology* 49.3 (2001): 181.

Siddiqui, Ruqaiyyah, et al. "Area 51: How do *Acanthamoeba* invade the central nervous system?." *Trends in parasitology* (2011): 185-189.

Siddiqui, Ruqaiyyah, and Naveed Ahmed Khan. "Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*." *Parasites & vectors* 5.1 (2012): 6.

Toriyama, Koji, et al. "Development of an immunochromatographic assay kit using fluorescent silica nanoparticles for rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis." *Journal of clinical microbiology* 53.1 (2015): 273-277.

Van Klink, F. et al. The role of macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 37, n. 7, p. 1271-81, Jun 1996.

Visvesvara, Govinda S., Hercules Moura, and Frederick L. Schuster. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 50.1 (2007): 1-26.

Wang, Y., X. Feng, and L. Jiang. "Current advances in diagnostic methods of *Acanthamoeba* keratitis." *Chinese medical journal* 127.17 (2013): 3165-3170.

5 DISCUSSÃO GERAL

Trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. são a forma metabolicamente ativa e também forma infectante para humanos como resultado de uma complexa interação entre patógeno e hospedeiro. Grande parte dos danos causados pela *Acanthamoeba* em infecções da córnea ou no cérebro de humano é resultante de vários fatores de virulência, sendo que destes processos, poucos são os aspectos conhecidos em nível molecular.

Assim sendo, estudos proteômicos abrangentes são úteis para a elucidação de tais fatores, a partir da identificação de proteínas envolvidas na interface patógeno-hospedeiro e de outras que participam ou viabilizam a infecção.

Visando tentar auxiliar nesse entendimento, o presente trabalho realizou um estudo proteômico de trofozoítos de um isolado ambiental de *A. castellanii* (ATCC 30010), pertencente ao grupo genotípico T4 e obtido a partir de amostra do solo. Embora um isolado ambiental, essa cepa viabilizou a infecção da córnea bem como infecção sistêmica em modelos animais (Verissimo et al. 2013).

No presente trabalho, utilizamos diferentes metodologias de extração de proteínas juntamente com estratégias experimentais complementares SDS-PAGE e LC-MS/MS para analisar proteínas expressas a partir de trofozoítos de *A. castellanii*. Como resultado final, obtivemos representado o maior conjunto de proteínas identificadas (dados proteômicos) de *Acanthamoeba* spp. até o momento (503 proteínas identificadas ao total), permitindo assim que futuros estudos comparativos entre espécies e até mesmo entre isolados virulentos sejam realizados. Em trabalho já realizado por nosso grupo, Caumo et al. (2014) identificou um total de 136 proteínas a partir de trofozoítos de *Acanthamoeba polyhaga*.

O perfil gerado no presente trabalho pelas diferentes frações protéicas (fração enriquecida com proteínas de superfície e fração solúvel) no SDS-PAGE apresentou diferenças significativas e marcantes, evidenciando o sucesso nos protocolos utilizados.

Esse é o primeiro estudo proteômico com trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* que utilizou uma metodologia para a extração de proteínas de membranas (fração enriquecida com proteínas). Receptores celulares são classificados com relação a sua localização celular, podendo ser receptores de superfície celular ou receptores intracelulares. Receptores de superfície celular são proteínas integrais transmembrana, presentes na membrana citoplasmática, sendo que uma série de proteínas integrais de membrana, presentes no sistema de endomembranas, que também atuam como receptores. Assim a identificação de proteínas a partir dessa metodologia de extração possibilita uma nova abordagem principalmente para a investigação de proteínas que possivelmente sejam importantes e essenciais na interação entre *Acanthamoeba* e célula do hospedeiro (Hennig *et al.* 2015).

Foi observada a identificação de proteínas que estão potencialmente envolvidas nos processos de adesão, invasão e conseqüentemente na patogenicidade desse protozoário, assim a patogênese da *Acanthamoeba* spp. pode ser melhor estudada e compreendida. Proteínas relacionadas em processos fisiológicos desse protozoário também foram identificadas. A partir desses resultados aqui apresentados, estudos mais específicos podem então ser conduzidos a fim de elucidar a real participação destas em possíveis rotas metabólicas e fisiológicas dessa ameba.

Com o objetivo de avaliar o potencial antigênico das proteínas identificadas no estudo, uma predição “*in silico*” foi realizada. Várias proteínas apresentaram uma grande quantidade de peptídeos antigênicos. A partir desses resultados prévios, estudos específicos podem ser conduzidos para realmente comprovar o potencial

antigênico das proteínas e talvez identificar uma proteína como real candidata a um teste de imunodiagnóstico.

Atualmente o diagnóstico se baseia na observação do parasito basicamente através da cultura ou ainda pela utilização de ferramentas moleculares como a PCR. Devido à alta morbidade e mortalidade (nos casos de encefalite amebiana) a identificação do agente etiológico é de extrema importância e muitas vezes a cultura pode levar vários dias para apresentar positividade para o parasito.

Assim sendo, uma ferramenta de imunodiagnóstico sensível e específica seria de grande valia para a identificação das enfermidades ocasionadas por *Acanthamoeba*. Até o momento técnicas imunológicas estão ainda em estudo e conseqüentemente a caracterização proteômica de *Acanthamoeba* spp se torna extremamente importante para possibilitar e viabilizar alguma técnica imunológica.

6. CONCLUSÕES

Este estudo é a primeira análise proteômica do repertório de proteínas expressas por trofozoítos de *A. castellanii* e o estudo proteômico mais abrangente realizado para o gênero.

O protocolo de extração de proteínas solúveis apresentou reprodutibilidade para a identificação da maioria das proteínas deste estudo.

O protocolo de extração da fração enriquecida com proteínas de membrana apresentou reprodutibilidade e permitiu a identificação de 119 proteínas.

A caracterização funcional realizada apresenta a possibilidade de uma melhor compreensão da fisiopatologia tanto da ceratite como das demais enfermidades causadas por *A. castellanii*.

A verificação da presença de peptídeos antigênicos nas proteínas identificadas possibilita que futuros estudos, mais específicos, sejam realizados a fim de obter um método de imunodiagnóstico sensível e específico para *Acanthamoeba* spp.

Atualmente dentre os métodos utilizados para o diagnóstico a cultura se mantém como a mais utilizada, sendo considerado o padrão ouro para o diagnóstico das patologias causadas por *Acanthamoeba* spp.

Técnicas como biópsia de tecido, microscopia direta da amostra biológica e ferramentas moleculares também são utilizadas.

7 REFERÊNCIAS

Ali IK, Haque R, Siddique A, Kabir M, Sherman NE, Gray SA, Cangelosi GA, Petri WA Jr. 2012. Proteomic analysis of the cyst stage of *Entamoeba histolytica*. PLoS Negl Trop Dis. v. 6, n. 5, 1643.

Alizadeh H, Apte S, El-Agha MS, Li L, Hurt M, Howard K, Cavanagh HD, McCulley JP, Niederkorn JY. 2001. Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis. Cornea, v. 20, n. 6, 622-7.

Alizadeh H¹, Li H, Neelam S, Niederkorn JY. 2008. Modulation of corneal and stromal matrix metalloproteinase by the mannose-induced *Acanthamoeba* cytolytic protein. Exp Eye Res. v. 87, n. 3, p. 286-91.

Alsam S, Jeong SR, Dudley R, Khan NA. 2008. "Role of human tear fluid in *Acanthamoeba* interactions with the human corneal epithelial cells." *International Journal of Medical Microbiology*. 298.3: 329-336.

Alsam S, Sissons J, Jayasekera S, Khan NA. 2005. Extracellular proteases of *Acanthamoeba castellanii* (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increased permeability in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J Infect*, v. 51, n. 2, p. 150-6.

Alves D de S, Moraes AS, Nitz N, de Oliveira MG, Hecht MM, Gurgel-Gonçalves R, Cuba CA. 2012. Occurrence and characterization of *Acanthamoeba* similar to genotypes T4, T5, and T2/T6 isolated from environmental sources in Brasília, Federal District, Brazil. Exp Parasitol, v. 131, n. 2, p. 239-44.

Barete S, Combes A, de Jonckheere JF, Datry A, Varnous S, Martinez V, Ptacek SG, Caumes E, Capron F, Francès C, Gibert C, Chosidow O. 2007. Fatal disseminated *Acanthamoeba lenticulata* infection in a heart transplant patient. Emerg Infect Dis. v. 13, n. 5, p. 736-8.

Biller L, Schmidt H, Krause E, Gelhaus C, Matthiesen J, Handal G, Lotter H, Janssen O, Tannich E, Bruchhaus I. 2009. Comparison of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. Proteomics, v. 9, n. 17, p. 4107-20.

Blackstock WP, Weir MP. 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. In: (Ed.). Trends Biotechnol. England, v.17, p.121-7.

Carvalho FR, Foronda AS, Mannis MJ, Höfling-Lima AL, Belfort R Jr, de Freitas D. 2009. Twenty years of *Acanthamoeba* keratitis. Cornea, v. 28, n. 5, p. 516-9.

Cash P. 1998. Characterisation of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. Analytica Chimica Acta, v. 372, n. 1-2, p. 121-145.

Cho JH, Na BK, Kim TS, Song CY. 2000. Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. IUBMB Life, 50, 209-214.

Choi DH, Na BK, Seo MS, Song HR, Song CY. 2000. Purification and characterization of iron superoxide dismutase and copper-zinc superoxide dismutase from *Acanthamoeba castellanii*. J Parasitol, v. 86, n. 5, p. 899-907.

Chusattayanond AD, Boonsilp S, Kasisit J, Boonmee A, Warit S. 2010. "Thai *Acanthamoeba* isolate (T4) induced apoptotic death in neuroblastoma cells via the Bax-mediated pathway." Parasitology international. 59.4 : 512-516.

Claerhout I, Goegebuer A, Van Den Broecke C, Kestelyn P. 2004. Delay in diagnosis and outcome of *Acanthamoeba* keratitis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. v. 242, n. 8, p. 648-53.

Clarke B, Sinha A, Parmar DN, Sykakis E. 2012. "Advances in the diagnosis and treatment of *Acanthamoeba* keratitis." Journal of ophthalmology.

Clarke DW, Niederkorn JY. 2006. The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. Microbes Infect, v. 8, n. 5, p. 1400-5.

Corsaro D, Venditti D. 2010. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). Parasitol Res, v. 107, n. 1, p. 233-8.

Corsaro D, Walochnik J, Köhler M, Rott MB. 2015. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). Parasitology research. 114(7), 2481-2490.

Dart JK, Saw VP, Kilvington S. 2009. *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *Am J Ophthalmol.* v. 148, n. 4, p. 487-499.e2.

Ferreira GA, Magliano AC, Pral EM, Alfieri SC. 2009. Elastase secretion in *Acanthamoeba polyphaga*. *Acta Trop.* v. 112, n. 2, p. 156-63.

Gatti S, Rama P, Matuska S, Berrilli F, Cavallero A, Carletti S, Bruno A, Maserati R, Di Cave D. 2010. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from corneal infections in Italy. *J Med Microbiol.* v. 59, n. Pt 11, p. 1324-30.

Goldschmidt P, Degorge S, Benallaoua D, Batellier L, Di Cave D, Chaumeil C. 2012. "Rapid detection and simultaneous molecular profile characterization of *Acanthamoeba* infections." *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 74.2: 137-141.

Graffi S, Peretz A, Jabaly H, Koiefman A, Naftali M. 2013. *Acanthamoeba* keratitis: study of the 5-year incidence in Israel. *British Journal of Ophthalmology.* 97 (11):1382-3.

Henriquez FL, McBride J, Campbell SJ, Ramos T, Ingram PR, Roberts F, Tinney S, Roberts CW. 2009. *Acanthamoeba* alternative oxidase genes: identification, characterisation and potential as antimicrobial targets. *Int J Parasitol,* v. 39, n. 13, p. 1417-24.

Hong YC, Lee WM, Kong HH, Jeong HJ, Chung DI. 2004. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a laminin-binding protein (AhLBP) from *Acanthamoeba healyi*. *Experimental Parasitology,* 106, 95–102.

Hurt M, Neelam S, Niederkorn J, Alizadeh H. 2003. Pathogenic *Acanthamoeba* spp. secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. *Infect Immun,* v. 71, n. 11, p. 6243-55.

Khan NA. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev.* v. 30, n. 4, p. 564-95.

Kim WT, Kong HH, Ha YR, Hong YC, Jeong HJ, Yu HS, Chung DI. 2006. Comparison of specific activity and cytopathic effects of purified 33 kDa serine proteinase from *Acanthamoeba* strains with different degree of virulence. *Korean J Parasitol,* v. 44, n. 4, p. 321-30.

Kim JY, Na BK, Song KJ, Park MH, Park YK, Kim TS.. 2012. Functional expression and characterization of an ironcontaining superoxide dismutase of *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitology Research.* 111, 1673–1682.

Ku JY, Chan FM, Beckingsale P. 2009. *Acanthamoeba* keratitis cluster: an increase in *Acanthamoeba* keratitis in Australia. Clin Experiment Ophthalmol. v. 37, n. 2, p. 181-90.

Im KI. 1990. "Pathogenic free-living amoebae." *Kisaengch'unghak chopchi*. The Korean journal of parasitology. 28: 29-39.

Jerlström-Hultqvist J, Stadelmann B, Birkestedt S, Hellman U, Svärd SG. 2012. Plasmid vectors for proteomic analyses in *Giardia*: purification of virulence. Eukaryot Cell. v. 11, n. 7, p. 864-73.

Lehmann OJ, Green SM, Morlet N, Kilvington S, Keys MF, Matheson MM, Dart JK, McGill JI, Watt PJ.. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci, v. 39, n. 7, p. 1261-5. Jun 1998.

Leitsch D, Köhler M, Marchetti-Deschmann M, Deutsch A, Allmaier G, König L, Sixt BS, Duchêne M, Walochnik J. 2010. Proteomic aspects of *Parachlamydia acanthamoebae* infection in *Acanthamoeba* spp. ISME J, v. 4, n. 11, p. 1366-74.

Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. 2015. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. Parasite, 22, 10.

MacLean RC, Hafez N, Tripathi S, Childress CG, Ghatak NR, Marciano-Cabral F. 2007. Identification of *Acanthamoeba* sp. in paraffin-embedded CNS tissue from an HIV+ individual by PCR. Diagn Microbiol Infect Dis, v. 57, n. 3, p. 289-94.

Maghsood AH, Sissons J, Rezaian M, Nolder D, Warhurst D, Khan NA. 2005. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. J Med Microbiol, v. 54, n. 8, p. 755-9.

Marciano-Cabral F, Puffenbarger R, Cabral GA. 2000. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. J Eukaryot Microbiol, v. 47, n. 1, p. 29-36.

Marciano-Cabral F, Bradley SG. 2001. Current research on free-living amoebae causing granulomatous amoebic encephalitis. J Eukaryot Microbiol. v. Suppl, p. 3S.

Marciano-Cabral F, Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev, v. 16, n. 2, p. 273-30.

Martinez AJ, Visvesvara GS. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amoebae. Brain Pathol, v. 7, n. 1, p. 583-98.

Mattana A, Cappai V, Alberti L, Serra C, Fiori PL, Cappuccinelli P.. 2002. ADP and other metabolites released from *Acanthamoeba castellanii* lead to human monocytic cell death through apoptosis and stimulate the secretion of proinflammatory cytokines. *Infection and Immunity*. 70, 4424–4432.

Matsumoto Y, Dogru M, Sato EA, Katono Y, Uchino Y, Shimmura S, Tsubota K. 2007. "The application of in vivo confocal scanning laser microscopy in the management of *Acanthamoeba keratitis*." *Mol Vis* 13.7 : 1319-1326.

Michalek M, Sönnichsen FD, Wechselberger R, Dingley AJ, Hung CW, Kopp A, Wienk H, Simanski M, Herbst R, Lorenzen I, Marciano-Cabral F, Gelhaus C, Gutschmann T, Tholey A, Grötzinger J, Leippe M. 2013. Structure and function of a unique pore-forming protein from a pathogenic *Acanthamoeba*, *Nat Chem Biol*. Vol. 9: 37-42.

Mortazavi PN, Keisary E, Loh LN, Jung SY, Khan NA. 2011. Possible roles of phospholipase A (2) in the biological activities of *Acanthamoeba castellanii* (T4 Genotype). *Protist*, v. 162, n. 1, p. 168-76.

Niederhorn JY. 2002. The role of the innate and adaptive immune responses in *Acanthamoeba keratitis*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, v. 50, n. 1, p. 53-9.

Nuprasert W, Putaporntip C, Pariyakanok L, Jongwutiwes S. 2010. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and t10 genotype causing keratitis in Thailand. *J Clin Microbiol*, v. 48, n. 12, p. 4636-40.

Yu Yee Ong T, Khan NA, Siddiqui R 2017. "Brain-eating amoebae: Predilection sites in the brain and disease outcome." *Journal of Clinical Microbiology*. JCM-02300.

Panjwani N. 2010. Pathogenesis of *Acanthamoeba keratitis*. *Ocul Surf*, v. 8, n. 2, p. 70-9.

Patel DV, Rayner S, McGhee CN. 2010. Resurgence of *Acanthamoeba keratitis* in Auckland, New Zealand: a 7-year review of presentation and outcomes. *Clin Experiment Ophthalmol*, v. 38, n. 1, p. 15-20; quiz 87.

Pawar H, Sahasrabudhe NA, Renuse S, Keerthikumar S, Sharma J, Kumar GS, Venugopal A, Sekhar NR, Kelkar DS, Nemade H, Khobragade SN, Muthusamy B, Kandasamy K, Harsha HC, Chaerkady R, Patole MS, Pandey A. 2012. A proteogenomic approach to map the proteome of an unsequenced pathogen - *Leishmania donovani*. *Proteomics*, v. 12, n. 6, p. 832-44.

Pussard M, Pons R. 1977. Morphology of cystic wall and taxonomy of genus *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, v. 13, n. 4, p. 557-598.

Rocha-Azevedo BD, Jamerson M, Cabral GA, Silva-Filho FC, Marciano-Cabral F. 2009. *Acanthamoeba* interaction with extracellular matrix glycoproteins: biological and biochemical characterization and role in cytotoxicity and invasiveness. *J Eukaryot Microbiol*, v. 56, n. 3, p. 270-8,

Sánchez AG, Virginio VG, Maschio VJ, Ferreira HB, Rott MB. 2016. "Evaluation of the immunodiagnostic potential of a recombinant surface protein domain from *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitology*. 1-9.

Saravanan C, Cao Z, Kumar J, Qiu J, Plaut AG, Newburg DS, Panjwani N. 2008. "Milk components inhibit *Acanthamoeba*-induced cytopathic effect." *Investigative ophthalmology & visual science*. 49.3: 1010-1015.

Schuster FL, Visvesvara GS. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol*. v. 34, n. 9, p. 1001-27.

Siddiqui R, Emes R, Elsheikha H, Khan NA. 2011. Area 51: How do *Acanthamoeba* invade the central nervous system? *Trends Parasitol*. v. 27, n. 5, p. 185-9.

Siddiqui R, Khan NA. 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*, 5(1), 6.

Sissons J, Alsam S, Jayasekera S, Khan NA. 2004. Ecto-ATPases of clinical and non-clinical isolates of *Acanthamoeba*. *Microbial Pathogenesis*, 37, 231–239.

Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ. 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol*, v. 45, n. 1, p. 45-54.

Thamtam VK, Uppin MS, Pyal A, Kaul S, Rani JY, Sundaram C. 2016. "Fatal granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a newly diagnosed patient with systemic lupus erythematosus." *Neurology India* 64.1: 101.

Thebpatiphat N, Hammersmith KM, Rocha FN, Rapuano CJ, Ayres BD, Laibson PR, Eagle RC Jr, Cohen EJ. 2007. *Acanthamoeba* keratitis: a parasite on the rise. *Cornea*, v. 26, n. 6, p. 701-6.

Tolstrup, J. 2007. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*, v. 134, n. Pt 2, p. 289-98.

Urbaniak MD, Guther ML, Ferguson MA. 2012. Comparative SILAC proteomic analysis of *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic lifecycle stages. *PLoS One*, v. 7, n. 5, p. e3661.

Van-Klink F, Taylor WM, Alizadeh H, Jager MJ, van Rooijen N, Niederkorn JY. 1996. The role of macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 37, n. 7, p. 1271-81.

Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 50, n. 1, p. 1-26.

Wen JJ, Garg NJ. 2012. Proteome expression and carbonylation changes during *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas disease in rats. *Mol Cell Proteomics*, v. 11, n. 4, p. M111.010918.

Young AL, Leboeuf NR, Tsiouris SJ, Husain S, Grossman ME. 2010. "Fatal disseminated *Acanthamoeba* infection in a liver transplant recipient immunocompromised by combination therapies for graft-versus-host disease." *Transplant Infectious Disease*. 12.6: 529-537.

APÊNDICES

Os artigos correspondem a trabalhos publicados durante o período de doutoramento como autor principal bem como em colaboração. Estes artigos referem-se ao isolamento, identificação morfológica, caracterização genotípica de isolados ambientais e estudos proteômicos de *Acanthamoeba* spp.

Curr Microbiol
DOI 10.1007/s00284-014-0532-9

Characterization of Isolates of *Acanthamoeba* from the Nasal Mucosa and Cutaneous Lesions of Dogs

A. M. Carlesso · M. B. Mentz · M. L. S. da Machado ·
A. Carvalho · T. E. T. Nunes · V. J. Maschio ·
M. B. Rott

Received: 26 September 2013 / Accepted: 17 December 2013
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract *Acanthamoeba* spp. are free-living amoebae that are ubiquitously distributed in the environment and can cause encephalomyelitis in animals and humans. The factors that contribute to *Acanthamoeba* infections include parasite biology, genetic diversity, environmental spread, and host susceptibility. The aim of the present study was to characterize isolates of *Acanthamoeba* from the nasal mucosa and cutaneous lesions of dogs in order to access the occurrence and pathogenicity of these organisms in this animal group. We studied 13 isolates of *Acanthamoeba* confirmed by polymerase chain reaction. They were sequenced, the genotype was determined, and their potential of pathogenicity was evaluated.



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Proteomic profiling of the infective trophozoite stage of *Acanthamoeba polyphaga*



Karin Silva Caumo^{a,1}, Karina Mariante Monteiro^b, Thiely Rodrigues Ott^b,
Vinicius José Maschio^a, Glauber Wagner^c, Henrique Bunselmeyer Ferreira^{b,*},
 Marilise Brittes Rott^a

^a Laboratório de Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP: 90050170 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP: 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade do Oeste de Santa Catarina, CEP: 89600-000 Joaçaba, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2014

Received in revised form 31 July 2014

Accepted 8 August 2014

Available online 18 August 2014

Keywords:

Acanthamoeba

Trophozoite

2-DE

LC-MS/MS

Global protein analysis

Pathogen–host interaction

ABSTRACT

Acanthamoeba polyphaga is a free-living protozoan pathogen, whose infective trophozoite form is capable of causing a blinding keratitis and fatal granulomatous encephalitis in humans. The damage caused by *A. polyphaga* trophozoites in human corneal or brain infections is the result of several different pathogenic mechanisms that have not yet been elucidated at the molecular level. We performed a comprehensive analysis of the proteins expressed by *A. polyphaga* trophozoites, based on complementary 2-DE MS/MS and gel-free LC-MS/MS approaches. Overall, 202 non-redundant proteins were identified. An *A. polyphaga* proteomic map in the pH range 3–10 was produced, with protein identification for 184 of 370 resolved spots, corresponding to 142 proteins. Additionally, 94 proteins were identified by gel-free LC-MS/MS. Functional classification revealed several proteins with potential importance for pathogen survival and infection of mammalian hosts, including surface proteins and proteins related to defense mechanisms. Our study provided the first comprehensive proteomic survey of the trophozoite infective stage of an *Acanthamoeba* species, and established foundations for prospective, comparative and functional studies of proteins involved in mechanisms of survival, development, and pathogenicity in *A. polyphaga* and other pathogenic amoebae.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

***Acanthamoeba* T4, T5 and T11 Isolated From Mineral Water Bottles in Southern Brazil**

**Vinicius José Maschio · Fernanda Chies · Ana Maris Carlesso ·
Amanda Carvalho · Sayonara Peixoto Rosa ·
Sueli Teresinha Van Der Sand · Marilise Brittes Rott**

Received: 4 May 2014 / Accepted: 28 June 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract *Acanthamoeba* is a protist potential pathogen, capable of causing a blinding keratitis in contact lens wearers and disseminated infection, leading to granulomatous amebic encephalitis in immunocompromised individuals. This amoeba is a ubiquitous organism that has been isolated from various domestic water systems, such as cooling towers and hospital water networks. The objective of this work was to investigate the presence of *Acanthamoeba* in mineral water bottles marketed in Porto Alegre, southern Brazil. Positive samples were further classified at the genotype level after sequencing the ASA.S1 region of 18S rDNA gene. Six of the eight isolates belonged to T5 genotype, one to T4 genotype, and one was T11. Several genotypes have been reported worldwide as causative of pathologies in humans, including genotypes T4, T5 and T11. Overall, the widespread distribution of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains in the studied source demands more awareness within the public and health professionals, because this pathogen is emerging as a risk for human health worldwide.

Evaluation of the immunodiagnostic potential of a recombinant surface protein domain from *Acanthamoeba castellanii*

ALEMAO G. CARPINTEYRO SÁNCHEZ¹, VERIDIANA GOMES VIRGINIO²,
VINICIUS JOSÉ MASCHIO¹, HENRIQUE BUNSELMEYER FERREIRA^{2,3} and
MARILISE BRITTES ROTT^{1,4*}

¹ Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

² Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

(Received 7 April 2016; revised 10 June 2016; accepted 26 June 2016)

SUMMARY

Acanthamoeba spp. are free-living protists widely distributed in environment, able to cause keratitis, encephalitis and skin lesions in humans and animals. *Acanthamoeba* spp. exist in two forms: an infective trophozoite and a dormant cyst. Several factors contribute to the pathogenesis of *Acanthamoeba* spp. The parasite adhesion to the host cell is the primary step for infection and is mediated by a mannose binding-protein, expressed in the surface and considered the main pathogenicity factor in *Acanthamoeba* spp. So far, there was no evidence of another surface protein of *Acanthamoeba* spp. relevant for host invasion or infection by these organisms. The aims of this study were to identify and characterize an *Acanthamoeba castellanii* surface protein and to evaluate its diagnostic potential. *In silico* predictions of surface proteins allowed to identify the *A. castellanii* calreticulin as a possible surface antigen. The coding sequence of a predicted extracellular domain of *A. castellanii* calreticulin was cloned by *in vivo* homologous recombination and the recombinant polypeptide (AcCRT₂₉₋₁₃₀) was produced. Its immunodiagnostic potential was assessed in a recombinant antigen-based ELISA with sera from experimentally infected rats that developed keratitis and encephalitis, and sera from patients with encephalitis. The AcCRT₂₉₋₁₃₀ was significantly more recognized by sera from encephalitis infected rats in comparison with the non-infected controls. Human sera from encephalitis patients, however presented no significant response. These results showed the AcCRT₂₉₋₁₃₀ potential for *A. castellanii* infection immunodiagnosis in animals, with further studies being required for assessment of its use for human infections.

Key words: *Acanthamoeba castellanii*, calreticulin, recombinant protein, immunodiagnostic, ELISA.