

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Marina Eichenberg Furasté

***Drosophila melanogaster* COMO MODELO PARA ESTUDO DAS INFECÇÕES  
CAUSADAS POR *Acanthamoeba* spp.**

Porto Alegre

2022

Marina Eichenberg Furaste

***Drosophila melanogaster* COMO MODELO PARA ESTUDO DAS INFECÇÕES  
CAUSADAS POR *Acanthamoeba* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Farmacologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Régis Adriel Zanette  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilise Brittes Rott

Porto Alegre

2022

Marina Eichenberg Furasté

***Drosophila melanogaster* COMO MODELO PARA ESTUDO DAS  
INFECÇÕES CAUSADAS POR *Acanthamoeba* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para  
a obtenção do título de mestra em Farmacologia e Terapêutica.

Aprovado em: 28 de abril de 2022.

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente

Karin Silva Caumo

Data: 24/01/2023 12:39:54-0300

CPF: \*\*\*.472.970-\*\*

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Karin Silva Caumo - UFSC

Luciana Dalla Rosa – UFRGS

Mirna Bainy Leal – UFRGS

Régis Adriel Zanette (orientador)

Marilise Brittes Rott (coorientadora)

## AGRADECIMENTOS

A Deus e meus anjinhos da guarda, por permitir, dentro da minha fé, que eu tivesse saúde e determinação, mesmo nos momentos de desânimo, para que eu concluísse os estudos, principalmente diante do quadro tão duro e desafiador de pandemia que se instalou no decorrer deste trabalho.

Ao meu orientador, Régis pela confiança depositada e parceria durante estes anos, iniciada ainda na graduação, principalmente pela paciência e puxões de orelha, além de todos os ensinamentos compartilhados. Obrigada por não desistir!

À professora Marilise, minha coorientadora, a quem eu tenho extrema admiração e gratidão, por sempre ter me dedicado palavras de apoio e segurança das quais me tiveram grande impacto, além de auxiliar, não medindo esforços, no que fosse necessário para que eu pudesse aprender e compreender todo o fantástico mundo das amebas de vida livre.

Às professoras da banca, Karin, Luciana e Mirna, pelo aceite do convite e por todas as contribuições que permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos queridos colegas de Drosolab: Jonnathan, extremamente dedicado e sempre carinhoso; e Simone, amiga e parceira de laboratório desde o meu TCC, com quem eu sempre pude dividir conversas, risadas, dores e alegrias do mundo pós-graduação, além de todo apoio no decorrer dos experimentos. Obrigada, vocês são maravilhosos!

A todos os amados colegas do grupo AVL, pelo auxílio depositado, cada qual à sua maneira: Beni, Brenda, Camila, Francisco, Thaisla, Veridiana, Vitor e, principalmente Denise, que me acompanhou de perto desde o início e sempre está disposta a auxiliar, com serenidade e amizade. Agradeço também ao grupo por todas as nossas reuniões quinzenais, onde a troca de experiências e ensinamentos foram fundamentais para o meu crescimento e aprendizagem, sentirei saudades.

A toda minha pequena grande família e meu porto seguro: meus pais, seu Pedro e dona Marília, meus sogros, Antônio e Zilá, meus irmãos queridos, agregados, sobrinhos, tios, dindas e cunhados por todo o incentivo e amor. E ao Rodrigo, meu fiel companheiro de vida, de madrugadas de estudo e a pessoa que mais aguentou todas as minhas angústias durante estes anos, obrigada pelo colo, te amo.

À Sandra, psicóloga e figura essencial nesta trajetória, para que eu sempre buscasse enxergar o melhor de mim, por mais difícil que fosse, e quem, por vezes, me ensinou a reacreditar na vida.

Aos meus amigos e irmãos da vida, os bananas: Leonardo, Livia, Carolina e Felipe, por toda cumplicidade sempre, amo vocês.

À equipe do Laboratório AXYS, pela elaboração e entrega das lâminas histológicas deste trabalho.

Ao Departamento de Farmacologia, pelos excelentes professores, servidores e técnicos, além de toda estrutura disponibilizada, em especial ao PPGFT e a todos os colegas com quem convivi.

Aos professores, demais colegas e técnicas do Laboratório de Parasitologia, pela convivência amigável e tranquila sempre.

A todos os meus inesquecíveis colegas de Ação COVID, com quem, enquanto o mundo todo parava, dividi dois intensos anos de trabalho voluntário nas atividades de diagnóstico da Covid19 no ICBS, cresci e aprendi muito com vocês.

À equipe da gerência administrativa do ICBS, onde sempre fui bem acolhida, pela estrutura, pelos cafezinhos, conversas e, sobretudo, pela amizade que com o tempo surgiu.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Enfim, agradeço a todos que acreditaram, torceram e contribuíram de alguma forma, mesmo que distante, para que meu caminho durante este trabalho pudesse ser mais leve e feliz.

## RESUMO

Amebas do gênero *Acanthamoeba* estão entre os protozoários ambientais mais prevalentes, podendo atuar como patógenos oportunistas ou não-oportunistas. Ceratite amebiana é a forma mais comum em indivíduos imunocompetentes, sobre a qual o tratamento não está bem definido, limitando o sucesso terapêutico. A mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster* tem sido utilizada com sucesso para estudos de resposta imune do hospedeiro, de fatores de virulência de patógenos e eficácia de compostos antimicrobianos. Assim, este trabalho objetivou propor um novo modelo para estudo da virulência e terapêutica frente a infecção por *Acanthamoeba* spp. através do uso de mosca-das-frutas como um método alternativo aos modelos animais convencionais. Foram realizados três ensaios independentes com moscas de linhagens *wild-type* (WT) e *Toll*-deficientes, inoculadas através do alimento e via punção traumática na região do tórax. A amostra de *Acanthamoeba* spp. utilizada foi de isolado clínico (genótipo T4) e com uma concentração de  $10^6$  trofozoítos/ml. Diariamente, por sete dias, registrou-se a mortalidade e coleta das moscas mortas. Foram realizados plaqueamento em ágar não nutriente para verificar a presença de células viáveis das amebas e cortes histológicos para confirmação da infecção. As taxas de mortalidade não foram significativas ( $p > 0,05$ ) na inoculação pela via oral, com valores de 18% para as moscas WT e 8% para as *Toll*-deficientes. Já na via por punção as drosófilas sucumbiram à infecção ( $p < 0,001$ ), onde as moscas do grupo WT apresentaram uma taxa de mortalidade mais elevada, em torno de 48%, enquanto no grupo *Toll*-deficiente este valor ficou em aproximadamente 35%. No cultivo em ágar os grupos da via oral não apresentaram crescimento relevante, sendo quase nulos, enquanto na via por punção obteve-se a recuperação de trofozoítos, tanto no grupo WT quanto no grupo *Toll*-deficiente. A análise histológica permitiu a observação de trofozoítos em diversas regiões do corpo da mosca, tanto do grupo *Toll*, quanto do grupo WT, fato não verificado em lâminas com moscas dos grupos controle. *D. melanogaster* se mostrou suscetível à infecção por amebas do gênero *Acanthamoeba*, apresentando-se como um modelo promissor.

*Palavras-chave:* *Acanthamoeba*; *Drosophila melanogaster*; modelo experimental; infecção.

## ABSTRACT

Amoebas of the genus *Acanthamoeba* are among the most prevalent environmental protozoa, acting as opportunistic or non-opportunistic pathogens. Amebic keratitis is the most common form in immunocompetent individuals, on which the treatment is not well defined, limiting the therapeutic success. The fruit fly *Drosophila melanogaster* has been successfully used for studies of host immune response, virulence factors of pathogens and efficacy of antimicrobial compounds. Thus, this work aimed to propose a new model for the study of virulence and therapy against infection by *Acanthamoeba* spp. through the use of fruit flies as an alternative method to conventional animal models. Three independent assays were carried out with wild-type (WT) and Toll-deficient flies, which were inoculated through food and via traumatic puncture in the thorax region. The sample of *Acanthamoeba* spp. used was a clinical isolate (T4 genotype) at a concentration of  $10^6$  trophozoites/ml. Mortality was recorded daily, for seven days, and dead flies were collected and plated on non-nutrient agar to verify the presence of viable amoeba cells and submitted to histology to confirm the infection. Mortality rates were not significant ( $p > 0.05$ ) in the oral inoculation, with values of 18% for WT flies and 8% for Toll-deficient flies. In the puncture assays, the *Drosophila* succumbed to the infection ( $p < 0.001$ ), where the flies of the WT group had the highest mortality rate, around 48%, while in the Toll-deficient group this value was approximately 35%. In the agar culture, the groups of the oral route did not show relevant growth, being almost null, whereas in the puncture route the recovery of trophozoites was obtained, both in the WT and in the Toll-deficient groups. The histological analysis allowed the observation of trophozoites in different regions of the fly's body, both in the Toll group and in the WT group, a fact that was not verified in flies from the control groups. *D. melanogaster* proved to be susceptible to infection by amoebas of the genus *Acanthamoeba*, presenting itself as a promising model.

*Keywords: Acanthamoeba; Drosophila melanogaster; modelo experimental; infecção.*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	17
Figura 2 – Morfologia de <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	21
Figura 3 – Visão de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> ao microscópio eletrônico de varredura.....	24
Figura 4 – Esquema resumido da patogênese de <i>Acanthamoeba</i> na ceratite.....	26
Figura 5 – Demonstração do procedimento de inoculação por via punção traumática na região lateral do tórax, próximo à base da asa.....	33
Figura 6 – Curvas de sobrevivência de moscas <i>D. melanogaster</i> wild-type (WT) e <i>Toll</i> -deficientes ( <i>Toll</i> ) infectadas por <i>Acanthamoeba</i> .....	35
Figura 7 – Placa de ANN com recultivo de moscas maceradas apresentando trofozoítos viáveis de <i>Acanthamoeba</i> (setas).....	36
Figura 8 – Corte histológico de mosca WT do grupo controle (A) e de mosca WT inoculada via punção (B); Trofozoítos em meio ao tecido (C).....	36



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs - Peptídeos antimicrobianos  
AVL – Ameba de vida livre  
ANN – Ágar não nutriente  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
EAG – Encefalite amebiana granulomatosa  
IgA – Imunoglobulina A  
IgG – Imunoglobulina G  
IL-12 – Interleucina 12  
Imd - Imunodeficiência  
MAP – Meningoencefalite amebiana primária  
MIP133 – Proteína induzida por manose com 133kDa  
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos  
PBS – Tampão salina fosfato  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase  
PYG – Proteose-peptona, levedura e glicose  
RNAr - Ácido ribonucleico ribossomal  
EROs – Espécies reativas ao oxigênio  
SNC – Sistema nervoso central  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa  
UV – Ultravioleta  
WT – *Wild-type*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA</b> .....	<b>13</b>
2.1	MODELOS ANIMAIS NA PESQUISA .....	13
2.1.1	<i>Drosophila melanogaster</i> .....	14
2.2	<i>Acanthamoeba</i> SPP .....	20
2.2.1	Ciclo de vida .....	21
2.2.2	Classificação morfológica e genotípica .....	22
2.2.3	Encefalite amebiana granulomatosa (EAG) .....	23
2.2.4	Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	24
2.2.5	Patogênese e fatores de virulência .....	25
2.2.6	Resposta imune .....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
4.1	ESTOQUE DE <i>Drosophila melanogaster</i> .....	30
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	30
4.3	CULTIVO DE <i>Acanthamoeba</i> SPP. ....	31
4.4	PREPARO DO INÓCULO CONCENTRADO DE CÉLULAS .....	31
4.5	INOCULAÇÕES .....	32
4.5.1	Inoculação via oral .....	32
4.5.2	Inoculação via punção .....	32
4.6	PLAQUEAMENTO EM ÁGAR NÃO NUTRIENTE (ANN) .....	33
4.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	33
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
4.9	IDENTIFICAÇÃO POR BIOLOGIA MOLECULAR .....	34
4.9.1	Extração de DNA das amostras .....	33
4.9.2	Eletroforese em gel de agarose .....	33
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>398</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) são microrganismos eucarióticos, protozoários amplamente distribuídos na natureza e em outros locais (solo, água tratada, esgotos, filtros de condicionadores de ar, etc.) e que, ocasionalmente, geram enfermidades em humanos, principalmente os imunocomprometidos. Na natureza, as bactérias exercem papel de decompositores primários da matéria orgânica, porém são incapazes de liberar os produtos minerais de seu organismo e, com isso então, as AVL, assim como outros protistas, exercem um papel importante no ecossistema ao se alimentarem destas bactérias, atuando como decompositores secundários e permitindo a eliminação destes nutrientes residuais (SIDDIQUI; KHAN, 2012).

Possuem capacidade de adaptação da vida na natureza a uma vida de parasitismo em humanos e/ou animais, e, por isso, são chamadas de anfitriônicas (PEREIRA; PEREZ, 2003). Entre as numerosas AVL conhecidas, apenas quatro gêneros, são até então, considerados patogênicos: *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e *Sappinia pedata* (VISVESVARA, 2013). Além da característica anfitriônica, essas amebas são capazes de internalizar e carregar outros patógenos, disseminando microrganismos como *Legionella* spp., *Vibrio* spp. e *Listeria* spp. (TRABELSI, 2012).

A espécie *N. fowleri* possui em seu ciclo de vida uma forma de trofozoíto, ativo e com a capacidade transitória de formar dois flagelos, exibindo um formato semelhante a uma pera; e, quando em condições desfavoráveis, uma forma de cisto, arredondado e com parede dupla, sendo assim, resistente (VISVESVARA; SCHUSTER, 2007). Essa espécie é responsável por uma doença aguda e fatal no sistema nervoso central (SNC), a meningoencefalite amebiana primária (MAP) e, sendo uma ameba com característica termofílica, é capaz de crescer em ambientes com uma faixa térmica de 30 até 45 °C, o que faz com que esta espécie seja encontrada também em águas termais. Geralmente a identificação causal só é possível após análises histopatológicas *post-mortem*, onde cistos ou trofozoítos podem ser observados infiltrados no tecido (MACIVER, 2020; JAHANGEER; MAHMOOD, 2020).

*B. mandrillaris*, outra espécie de AVL com capacidade patogênica, pode levar a lesões cutâneas e encefalite fulminante. Porém, ao contrário das anteriores, esta

espécie não se alimenta de bactérias e não se distribui extensamente, estando presente principalmente no solo. O seu ciclo de vida apresenta trofozoíto ativo pleomórfico e cisto formado com três paredes: o ectocisto, camada mais externa, fina e irregular; uma camada intermediária, chamada de mesocisto fibrilar e a camada interna, o ectocisto, que é a parede mais espessa (VISVERVARA, 2007; LORENZO-MORALES, 2013). Infecções por esta espécie são de difícil diagnóstico e muitos casos acabam não sendo identificados devido ao desconhecimento por parte dos médicos e laboratórios, mesmo que sejam de rara ocorrência (SCHUSTER *et al.*, 2009).

O gênero *Sappinia* consiste em duas espécies conhecidas: *Sappinia diploidea* e *S. pedata*, sendo esta última a responsável pelo primeiro e único caso de infecção oportunista identificado em humanos até então. Este caso foi reportado em um homem, imunocompetente, de 38 anos de idade, morador de uma fazenda no Texas, Estados Unidos (GELMAN, 2001). Esta ameba é encontrada em fontes ambientais tais como solo, água e fezes de humanos e alguns animais mamíferos (bovinos, alces). O trofozoíto deste gênero, considerado grande em comparação aos demais, é oval e alongado e possui dois núcleos, além de diversos vacúolos no citoplasma (VISVERVARA, 2007). O cisto é redondo e fino e sem poros na membrana. A característica binucleada, única nesta espécie, foi fator definitivo na identificação desta ameba no tecido do caso reportado (VISVERVARA, 2007). Após receber tratamento e retirar uma região necrótica do cérebro, o paciente recuperou-se bem e sem sequelas. Na ocasião, a espécie foi identificada como *S. diploidea*, porém mais tarde, a partir de novos testes moleculares e sequenciamento genético utilizando PCR em tempo real, descobriu-se pertencer a *S. pedata* (TRABELSI *et al.*, 2012).

O gênero *Acanthamoeba* é capaz de infectar indivíduos imunocomprometidos, desenvolvendo a encefalite amebiana granulomatosa (EAG), doença rara e fatal do SNC, ou de atingir outros órgãos, desenvolvendo lesões cutâneas, renais, pulmonares, etc. (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). Em indivíduos imunocompetentes, principalmente os que fazem uso de lentes de contato de forma incorreta (uso de produtos não destinados para lavagem, dormir e/ou tomar banho utilizando lentes), *Acanthamoeba* spp. podem levar ao aparecimento da ceratite amebiana (infecção da córnea), de maneira persistente e de difícil tratamento.

Os mecanismos de defesa imunológica que atuam contra *Acanthamoeba* spp. não estão bem caracterizados, da mesma forma, o tratamento com regimes multifármacos para humanos com infecções por *Acanthamoeba* spp. tem gerado

resultados discrepantes. Dessa forma, se faz necessário estabelecer um modelo fidedigno para o estudo da virulência e da terapêutica frente a esse protozoário.

A mosca-das-frutas, *Drosophila melanogaster*, é um organismo modelo genético amplamente estudado e desenvolvido para a compreensão de assuntos em diversas áreas: genética, fisiologia comportamental, mecanismos de doenças, interação hospedeiro-patógeno, fatores de virulência, efetividade de fármacos, etc. (PANDEY; NICHOLS, 2011). Este trabalho baseou-se na hipótese de que as moscas *D. melanogaster* seriam suscetíveis à infecção por *Acanthamoeba* spp., principalmente moscas com sinalização imune deficiente (*Toll*-deficientes), já que essas não conseguem montar uma resposta imune adequada frente aos microrganismos. Para que haja uma melhor compreensão dos mecanismos de resposta imune de um hospedeiro, é essencial entender como ocorre a invasão e infecção do patógeno às células (HIROYASU, 2018). Através da drosófila como organismo modelo, é possível projetar estudos que possibilitam identificar fatores de virulência que contribuem para a infecção ou morte de um hospedeiro induzidas por patógenos (YOUNES *et al.*, 2020). Juntamente com os detalhes da localização intracelular do patógeno e a resposta celular, esses dados podem fornecer pistas sobre a resposta do hospedeiro à infecção e as organelas celulares com as quais o micróbio interage (HIROYASU, 2018).

Com isso, objetivamos dar início ao estabelecimento de um potencial modelo alternativo *in vivo* utilizando moscas *D. melanogaster* para estudo da virulência e terapêutica das infecções causadas por AVL do gênero *Acanthamoeba*.

## 2 CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA

### 2.1 MODELOS ANIMAIS NA PESQUISA

Registros do uso de animais em pesquisas científicas são descritos desde o século V a.C, porém a popularização e crescimento deste método se deu a partir do século XIX (MIZIARA, 2012). Todavia, apesar de antigos e amplamente utilizados, atualmente, os modelos experimentais com animais geram sensibilização e debate na comunidade em geral e, a cada ano, milhões de animais são utilizados em diversas pesquisas em todo o mundo, embora muitos países ainda não tenham uma regulação específica para este tema (GUIMARAES, 2016).

No Brasil, apenas no ano de 2008 este tema foi regulamentado, com a Lei 11.794, também conhecida como Lei Arouca, revogando a Lei 6638, de 1979, estabelecendo então os procedimentos para o uso científico de animais (PONTES REGIS, 2012). Após a publicação da lei, passaram a ser criadas as Comissões de Ética para Uso de Animais, nas instituições de pesquisa, com o objetivo de avaliar e fiscalizar os estudos com o uso de animais, priorizando o bem-estar, além de diminuir, sempre que possível, o número de espécimes envolvidos.

Anterior à criação desta lei no Brasil, no final da década de 50 foi proposto por Russel e Burch, dois cientistas ingleses, o princípio dos três R's, do inglês: *replace* (substituir), *reduce* (reduzir) e *refine* (refinar), visando buscar outras formas de testagem e evitar e/ou diminuir a utilização de animais (PONTES REGIS, 2012). A redução, em seu significado literal, propõe uma diminuição do número de animais utilizados partindo principalmente de uma adequação mais atenta entre projetos, experimentos e métodos estatísticos. O refinamento é tido como qualquer diminuição possível na ocorrência e intensidade de procedimentos considerados desumanos aos animais, caso ainda sejam necessários. Por fim, a substituição define-se como o emprego de matérias não sencientes em alternativa ao uso de animais vivos conscientes. Pode ser dividida ainda entre uma substituição absoluta, onde é possível eliminar totalmente o uso de animais vertebrados no estudo e uma substituição relativa, onde ainda se faz necessário o uso de animais, porém sem exposição direta ou quase nula ao sofrimento (BALLS, 2020).

Este conceito inicial proposto por Russel e Bruch e amplamente aceito, evoluiu juntamente com o mundo moderno e o surgimento de novas tecnologias. Segundo

Michael Balls, no artigo intitulado “*It’s Time to Reconsider The Principles of Humane Experimental Technique*”, uma definição mais ampla dos três R’s deve ser estabelecida. Sob argumentação de que muitos medicamentos novos são altamente dependentes de procedimentos prévios em animais antes da aceitação em uso clínico, o autor propõe que não haja uma substituição total, mas sim um conjunto de métodos que produzam resultados semelhantes, aproveitando o desenvolvimento em biologia celular e molecular, bem como da ciência da computação para permitir testes pré-clínicos mais específicos e apropriados para que posteriormente sejam aplicáveis nos seres humanos (BALLS, 2020).

O desenvolvimento e a evolução de métodos estatísticos, através do estabelecimento de um nível de significância a partir de uma pequena amostra, também fez com que os experimentos fossem mais refinados e com mais racionalidade no uso de animais (PRESGRAVE, 2012). Com isto, os pesquisadores iniciaram a busca por métodos alternativos, a fim de substituir, na medida do possível, os modelos mamíferos (ratos, coelhos, porcos) por outros não mamíferos ou até mesmo invertebrados (CC *et al*, 2021). Entre estas opções ao uso de animais que foram surgindo ao longo do tempo, têm-se os simuladores e modelos matemáticos, sistemas *in vitro* como culturas de células, e os animais não convencionais (roedores silvestres, peixes, insetos, nematódeos, entre outros). Um destes modelos alternativos é a mosca-das-frutas *D. melanogaster*, amplamente utilizada em pesquisas de diferentes áreas: biologia comportamental, genética, ecologia, farmacologia, imunologia, etc. (LAYLA, 2010).

### 2.1.1 *Drosophila melanogaster*

Os estudos com a mosca-das-frutas em pesquisas ocorreram pela primeira vez há mais de cem anos, no começo do século XX, com o Dr. Castle, em 1906 e o Dr. Morgan, em 1909 (YOSHIDA, 2018). A exploração deste organismo por Morgan, na Universidade de Columbia (Nova Iorque, EUA), rendeu grandes avanços com o passar do tempo, principalmente na pesquisa genética, além do Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina no ano de 1933, pelas descobertas do papel dos cromossomos na hereditariedade. No ano de 1995, outro Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina foi concedido a três pesquisadores pelos resultados obtidos a partir da *D. melanogaster*,

sobre controle genético e desenvolvimento embrionário: Edward B. Lewis, Christiane N. Volhard e Eric F. Wieschaus, (PANDEY & NICHOLS, 2011).

Porém, foi a partir do ano 2000 que os caminhos da pesquisa genética mudaram de forma drástica, quando *D. melanogaster* foi o primeiro organismo complexo a ter seu genoma sequenciado, levando a grandes progressos em estudos do genoma humano, servindo até hoje como base, pois muitas técnicas e demais descobertas foram posteriormente traduzidas para os sistemas mamíferos (PANDEY & NICHOLS 2011; ADAMS *et al.*, 2000).

Na década de 1960, o cientista estadunidense Seymour Benzer deu início aos estudos de neurogenética a partir das drosófilas, com resultados e descobertas sobre comportamento, aprendizado, noção de tempo, entre outros. Devido a isso, a compreensão acerca de conceitos de diversas doenças neurodegenerativas melhorou consideravelmente com o passar do tempo (STEPHENSON, 2013).

Atualmente, com a utilização da mosca, é possível realizar estudos sobre diversas infecções com análise de tecidos e órgãos sem as preocupações éticas que acompanham os demais modelos experimentais comumente utilizados. Além disso, alguns microrganismos usam, em grande parte, mecanismos de virulência semelhantes para infectar moscas e mamíferos, sendo assim, muitos fatores eficazes contra mamíferos também são responsáveis pela patogenicidade nas moscas.

Além da mosca adulta, ovos, pupas e larvas também podem ser utilizados, como, por exemplo, estudos de processos fisiológicos, de desenvolvimento, aprendizagem e memória, que geralmente utilizam a larva no terceiro estágio (PANDEY; NICHOLS, 2011; YOSHIDA, 2018).

Do mesmo modo, a mosca-das-frutas também tem sido utilizada com sucesso também em diversas outras áreas, como resposta imune do hospedeiro, fatores de virulência de patógenos, eficácia de compostos antimicrobianos, etc.; provendo inúmeras vantagens: baixo custo de manutenção, rápido ciclo de vida, farto material na literatura científica, entre outros (ASHBURNER, 2005; ROBERTS, 1998).

#### 2.1.1.1 Biologia e desenvolvimento

Por ser um organismo holometábolo (com metamorfose completa), o ciclo de vida das drosófilas pode ser dividido em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto,

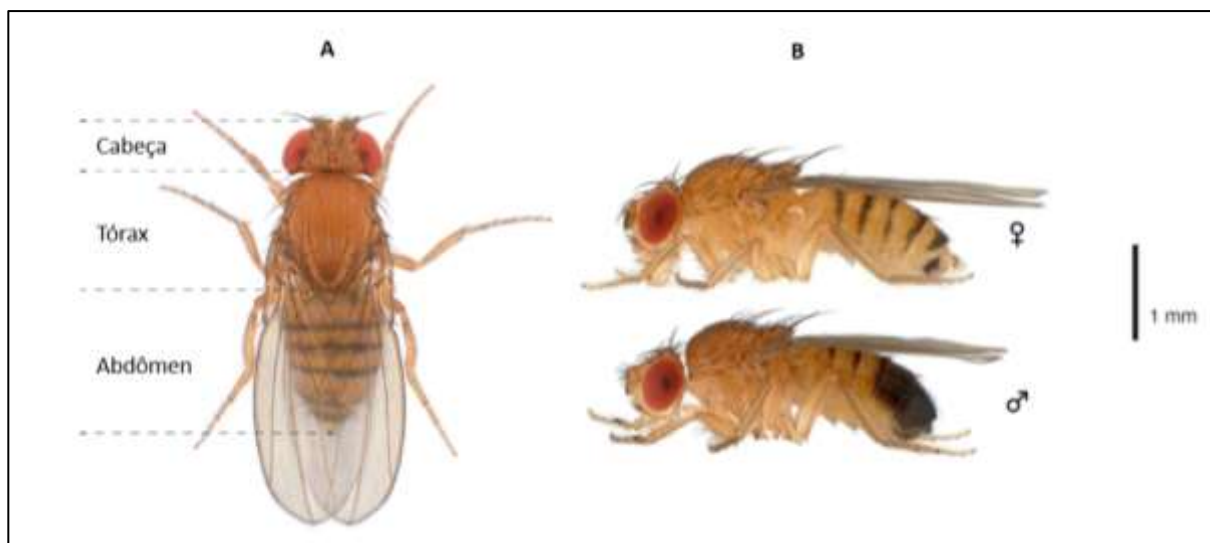


com duração média de 8-12 dias e, ocorre preferencialmente à temperatura ideal de 25 °C. Imersos no alimento ou meio de cultura, os ovos eclodem cerca de 24 h após a postura das fêmeas e, então, por 4-5 dias, a larva passa por seus três estágios (L1, L2 e L3) até emergir para se fixar em alguma superfície e se transformar na pupa, onde o processo de metamorfose ocorre, durante mais 4-5 dias até surgir uma nova mosca (CHYB; GOMPEL, 2013).

Ao eclodir da pupa, possui seu corpo alongado e pálido, com asas escuras e amassadas, que expandirão dentro de 1-2 h, assim como o exoesqueleto que endurece e escurece. Durante as primeiras 8 h após emergir da pupa, as fêmeas permanecem em um estado não receptivo à cópula, chamadas neste período de fêmeas virgens. Estas fêmeas virgens possuem corpo mais esbranquiçado, abdômen distendido e com uma pequena mancha de cor preta, a qual corresponde ao mecônio (material residual da pupa), que é eliminado após o período de 8 horas. São estas moscas as ideais para uso nos experimentos, facilitando a estabilidade do número amostral no decorrer dos estudos (The Fly Manual, 2022).

Como todos os demais insetos, a mosca-das-frutas possui o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen. Outra característica é o dimorfismo sexual (Figura 1), portanto, os machos e as fêmeas podem ser facilmente distinguidos pela morfologia externa (CHYB; GOMPEL, 2013). Os machos são um pouco menores, com o abdômen arredondado, onde se observa, na extremidade ventral, o arco genital. Além disso, os machos também possuem como diferencial uma estrutura pilosa na base do metatarso, chamada pente sexual. Em contrapartida, as fêmeas são maiores e com o abdômen mais pontiagudo na extremidade distal, com uma estrutura genital menor, pontiaguda e de cor clara (The Fly Manual, 2022).

**Figura 1 – Morfologia de *Drosophila melanogaster*. A) Visão dorsal das partes principais do corpo: cabeça, tórax e abdômen. B) Visão lateral de fêmea e macho e suas diferenças morfológicas.**



Fonte: adaptado de Chyb e Gompel (2013).

#### 2.1.1.2 Resposta imune inata e seus mecanismos

Sabe-se que a resposta imune adaptativa (específica) é aquela que se desenvolve ao longo da vida, formando moléculas de memória mediante a exposição a diferentes antígenos. As drosófilas, assim como a maioria dos demais invertebrados, possuem apenas a resposta imune inata desenvolvida, cuja atuação é a primeira linha de defesa do organismo frente a moléculas ou microrganismos estranhos, da qual envolve barreiras físicas, mediadores químicos, células especializadas, entre outros (PARSONS; FOLEY, 2016). Além disso, esta resposta pode ser celular ou humoral, onde a celular consiste em processos de fagocitose e encapsulamento e a humoral funciona a partir de cascatas proteolíticas que levam à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e à produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), moléculas essenciais para a defesa inata e produzidas em grandes quantidades pelo corpo gorduroso (um órgão análogo ao fígado dos mamíferos) e pelo epitélio (TROHA; BUCHON, 2019).

A barreira epitelial, também chamada de resposta local, consiste basicamente na produção de ERO's, além dos AMPs. Genes de expressão para diferentes AMP's estão em várias superfícies epiteliais das quais possuem contato com o ambiente externo. Na mosca-das-frutas, os principais locais envolvidos nesta defesa são a

cutícula, a mucosa digestiva e a traqueia (LEMAITRE; HOFFMAN, 2007). Há também as lisozimas, um grupo de enzimas digestivas com propriedades antimicrobianas, que são expressos no intestino e são bons candidatos para a regulação da microbiota.

Os insetos possuem o sistema circulatório aberto, onde a hemolinfa (fluido circulatório) transita diretamente na cavidade e entre os órgãos e as células circulatórias são denominadas hemócitos (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). Em relação à resposta do sistema nas drosófilas, o mecanismo envolvido é a resposta celular, que consiste na fagocitose de microrganismos ou então no encapsulamento e melanização de vasos maiores, através das células especializadas a partir destes hemócitos, que podem ser classificados de acordo com a sua estrutura e função: plasmócitos, responsáveis pelo processo de fagocitose; os lamelócitos, responsáveis pela encapsulação e neutralização de fatores demasiadamente grandes para sofrerem fagocitose; e as células cristalinas, responsáveis pelo processo de melanização (TROHA; BUCHON, 2019; PARSONS; FOLEY, 2016).

Por fim, a resposta humoral, que inclui as diversas cascatas proteolíticas e produção de EROs e AMPs através do corpo gorduroso, não é totalmente específica, mas é capaz de distinguir algumas classes de microrganismos, como bactérias e fungos. No caso das drosófilas, até o momento, são sete peptídeos identificados de acordo com sua função: drosomicina e metchnikowin com ação antifúngica; atacina, dipterocina, drosocina e cecropina para bactérias gram-negativas; defensina para bactérias gram-positivas (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007).

Estes mecanismos de resposta possuem duas principais vias de sinalização: a via *Imd*, mais importante contra bactérias gram-negativas; e a via *Toll*, contra bactérias gram-positivas e fungos. Moscas deficientes da sinalização *Toll* têm se mostrado igualmente úteis em estudos de patogenia e prospecção de fármacos frente a fungos oportunistas (CHAMILOS *et al.*, 2008; LIONAKIS *et al.*, 2005).

### 2.1.1.3 Modelos de infecção com *Drosophila*

Por ser um modelo alternativo promissor e de grande potencial, a mosca-das-frutas já foi utilizada em diversos estudos envolvendo microrganismos, patogênicos e oportunistas, como *Aspergillus* (LIONAKIS *et al.*, 2005), *Candida* spp. (CHAMILOS *et al.*, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (LAU *et al.*, 2003), *Cryptococcus neoformans*

(APIDIANAKIS *et al.*, 2004), *Staphylococcus aureus* (BEM-AMI *et al.*, 2013), *Pythium insidiosum* (ZANETTE *et al.*, 2013), *Mycobacterium abscessos* (OH *et al.*, 2013), *Fusarium spp.*, *Scedosporium spp.* (LAMARIS *et al.*, 2007) e fungos da ordem Mucorales (CHAMILOS *et al.*, 2008).

Em estudos com protozoários, há pesquisas de interações parasito-hospedeiro através de células fagocitárias da drosófila e de estágios intracelulares de *Leishmania donovani* (PELTAN *et al.*, 2012). Apesar de divergências nos genomas, a drosófila serve também como substituta do mosquito vetor da malária, em estudos de fatores do hospedeiro com o protozoário.

Schneider e Shahabuddin (2000) conduziram um estudo objetivando testar o desenvolvimento do parasito *Plasmodium gallinaceum* (causador de malária aviária) nas drosófilas, a partir de uma alimentação com sangue contaminado. Foi possível demonstrar que a drosófila permitiu o desenvolvimento dos oocistos de *Plasmodium* em esporozoítos, tais quais os produzidos nos mosquitos. Além disso, confirmaram a infectividade dos esporozoítos em infecções bem-sucedidas conduzidas em galinhas. Até o presente momento, não se tem registros na literatura de pesquisas realizadas com AVL em *D. melanogaster*.

#### 2.1.1.4 Resposta imune frente a parasitos

Os AMPs são essenciais na resposta imune, principalmente dos invertebrados, com seu amplo espectro no combate a bactérias, fungos e vírus, todavia a ação frente a parasitos protozoários ainda não foi investigada detalhadamente (TONK *et al.*, 2019). Alguns peptídeos são capazes de induzir morte celular apoptótica, incluindo a quebra do potencial de membrana mitocondrial e ativação da caspase-3, por exemplo na *Leishmania* (PRETZEL *et al.*, 2013). Em um estudo com moscas tsé-tsé, vetor de *Trypanosoma brucei* (causador da doença do sono), após serem imunoestimuladas, foi detectada uma diminuição na taxa de infecção, além da presença de defensina, atacina e cecropina na hemolinfa, após infecção via oral pelo alimento infectado com o parasito (PRETZEL *et al.*, 2013).

Além da ação a partir dos AMPs, uma resposta comum manifestada no local da invasão é a melanização, reação resultante da ativação da enzima profenoloxidase, ainda que o mecanismo exato pelo qual ocorre esta ativação

permaneça desconhecido (CARTON, 1997). Sabe-se também que os hemócitos na drosófila, após uma infecção, sofrem diferenciação para lamelócitos, células com importante papel na encapsulação ao redor de parasitas maiores (HULTMARK, 2003). Internalizado na cápsula formada, o parasito sofre ação de produtos citotóxicos como EROs e intermediários da melanização (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007).

O estudo da resposta imune das drosófilas frente a parasitos, especialmente protozoários, ainda é um campo com muito a ser explorado. O uso da mosca-das-frutas para estudo de características específicas dos hemócitos são de grande valia para estabelecer paralelos com a resposta celular em humanos (PARSONS; FOLEY, 2016).

## 2.2 *Acanthamoeba* SPP.

As AVL do gênero *Acanthamoeba* são as mais comumente encontradas, com ampla variedade e distribuição ambiental. Estão presentes em locais como solo, poeira, ar, água natural e tratada, água do mar, piscinas, esgoto, aparelhos de ar-condicionado, água da torneira, estações de tratamento de água, água engarrafada, unidades de diálise, lentes de contato e estojos de lentes, entre outros (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). Do grego, “acanto” significa espinhos, termo acrescentado ao “amoeba” em referência aos acantopódios, pseudópodes presentes na superfície celular responsáveis por funções como locomoção, apreensão, alimentação e adesão (SIDDIQUI; KHAN, 2012).

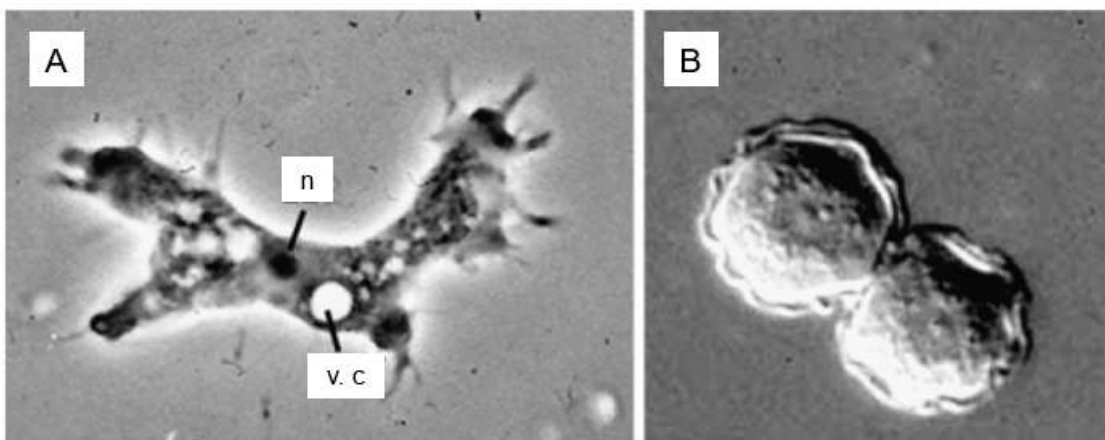
Apesar de serem de vida livre, estas amebas são importantes veículos de transmissão de outros patógenos, pela capacidade de abrigarem bactérias, fungos e/ou vírus endossimbiontes, podendo atuar como agentes patogênicos oportunistas e não-oportunistas em humanos. Por serem extremamente resistentes, os cistos não costumam sucumbir ao tratamento com os desinfetantes mais comuns, tornando sua eliminação praticamente impossível. As patologias mais frequentemente associadas à infecção por amebas do gênero *Acanthamoeba* são a EAG, doença quase sempre fatal que acomete indivíduos com algum grau de imunodeficiência e, em pessoas imunocompetentes, a ceratite por *Acanthamoeba*, infecção dolorosa da córnea, principalmente em usuários de lentes de contato (SIDDIQUI; KHAN, 2012; VISVERVARA, 2007).

### 2.2.1 Ciclo de vida

O ciclo de vida deste protozoário consiste de duas fases: uma metabolicamente ativa, na forma de trofozoítos, e uma de resistência, na forma de cistos (Figura 2). Os trofozoítos dividem-se de maneira assexuada, por fissão binária e alimentam-se de bactérias, fungos e leveduras ou pequenas partículas orgânicas do ambiente, porém também podem alimentar-se sem a presença de microrganismos, por absorção de nutrientes através da pinocitose (KHAN, 2006; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). Outra característica deste gênero é a presença de diversos vacúolos no citoplasma, responsáveis por diferentes funções como digestão, regulação osmótica e reserva energética (SIDDIQUI; KHAN, 2012).

Em situações de privação de alimento, extremos de temperatura, pH ou outras condições adversas (presença de desinfetantes ou antibióticos), os trofozoítos transformam-se em cistos, capazes de resistir por prolongados períodos (meses a anos), tornando-se viáveis e ativos novamente ao retornarem às circunstâncias ideais. Estes cistos são compostos de uma dupla parede formada de celulose, sendo uma mais externa denominada ectocisto, constituída também de proteínas e polissacarídeos e uma mais interna, o endocisto. Possuem, em alguns pontos, uma pequena abertura, os ostíolos (ou opérculos), cuja função consiste em monitorar o ambiente externo e também realizar o desencistamento da ameba.

**Figura 2 – Morfologia de *Acanthamoeba castellanii*. A) trofozoíto; B) cistos.**



Legenda: n, núcleo; v.c, vacúolo contrátil. Aumento de 1000x.

Fonte: Adaptado de Visvervara e Schuster (2007).

### 2.2.2 Classificação morfológica e genotípica

Inicialmente, a classificação de *Acanthamoeba* spp. baseou-se apenas de acordo com o tamanho e a morfologia dos cistos, conforme proposto por Pussard e Pons em 1977. Foram estabelecidos três grupos: grupo I, com cistos grandes ( $\geq 18 \mu\text{m}$ ), endocisto estrelado e ectocisto redondo liso ou rugoso; grupo II, com cistos de tamanho  $\leq 18 \mu\text{m}$ , endocisto estrelado, poligonal, triangular ou oval e ectocisto irregular ou rugoso e o grupo III, com cistos de tamanho  $\leq 18 \mu\text{m}$ , endocisto redondo e ectocisto arredondado, fino e liso (PUSSARD; PONS, 1977; CORSARO, 2020; VISVERVARA; SCHUSTER, 2007). Atualmente, existem 30 espécies descritas essencialmente por estes critérios, porém esta classificação acabou por ficar defasada com o passar do tempo, necessitando de um reforço mais fidedigno, pois verificou-se que a morfologia dos cistos pode sofrer alterações de acordo com as condições de cultivo em que se encontram (CORSARO, 2020; KHAN, 2012).

Por conseguinte, esta identificação morfológica foi associada a técnicas de sequenciamento genético, utilizando o gene 18s rRNA, (correspondente a uma região da menor subunidade ribossomal de células eucarióticas), amplamente utilizado em testes moleculares para exploração genética de microrganismos e análises de diversidade biológica (WILSON; CATE, 2012; KHAN, 2012).

A partir de então, foi possível agrupar 22 genótipos diferentes (T1 a T22), abrangendo todos os isolados encontrados até o momento (DIEHL, 2021; CORSARO 2017), sendo que, algumas espécies como *A. polyphaga* e *A. castellanii*, possuem característica polifilética, ou seja, podem ser relacionadas a mais de um genótipo ao mesmo tempo, enquanto outras são de genótipo único, como é o caso da *Acanthamoeba lenticulata* (T5) (CORSARO *et al.*, 2017).

Outra descoberta ao longo destes estudos é de que grande parte das amostras ambientais e de casos de infecções por *Acanthamoeba* spp. em humanos refere-se a isolados do genótipo T4 (KHAN, 2012; CORSARO, 2020), porém os motivos ainda não estão totalmente esclarecidos.

### 2.2.3 Encefalite amebiana granulomatosa (EAG)

Indivíduos imunocomprometidos, tais como os submetidos à quimioterapia para câncer, os transplantados ou os HIV-positivos, quando infectados por *Acanthamoeba*, podem desenvolver apresentações clínicas variáveis, desde lesões cutâneas, nasofaríngeas, pulmonares, renais, e também a EAG, muito semelhante às demais já citadas anteriormente, uma infecção insidiosa, crônica e de lenta progressão. Apesar de raro, já foram relatados alguns casos em indivíduos imunocompetentes. Esta patologia possui alguns sintomas geralmente confundidos com outras origens, como dor de cabeça, rigidez de nuca, anormalidades do estado mental, náuseas, vômitos, febre baixa, letargia, ataxia cerebelar, distúrbios visuais, hemiparesia, convulsões e até mesmo o coma (VISVERVARA; SCHUSTER, 2007).

A ameba penetra no organismo pelo trato respiratório ou através de lesões na pele, incluindo possibilidade de uma disseminação sistêmica através do sangue ou epitélio olfatório, até atingir o SNC, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (TRABELSI *et al.*, 2012). A EAG por *Acanthamoeba* spp. também desenvolve reações inflamatórias e locais de necrose hemorrágica no tecido cerebral, contudo não se sabe ao certo se essas lesões são causadas apenas pela ação dos trofozoítos, pelos mediadores inflamatórios ou por ambos os fatores (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

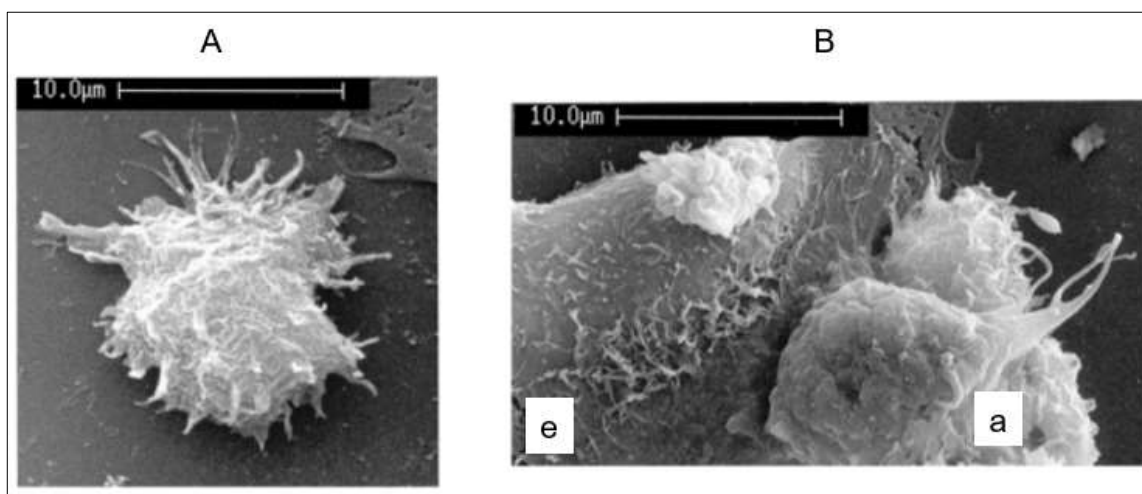
O tratamento da doença é difícil devido à demora em obter-se um diagnóstico correto, bem como à confusão na identificação dos sintomas, porém, pacientes acometidos sem o envolvimento do SNC, obtiveram bons resultados quando tratados com uma combinação dos fármacos: isetionato de pentamidina, sulfadiazina, flucitosina e fluconazol ou itraconazol (VISVERVARA; SCHUSTER, 2007). O prognóstico da doença, especialmente em indivíduos imunocomprometidos e com acometimento do SNC, é desfavorável, com a identificação causal apenas em exames de biópsia *post mortem*.



#### 2.2.4 Ceratite por *Acanthamoeba* spp.

A ceratite por *Acanthamoeba* spp. é a forma de apresentação mais comum de infecções deste gênero, sobretudo em indivíduos imunocompetentes e usuários de lentes de contato (GUIMARAES *et al.*, 2016) (Figura 3). Considerada multifatorial, envolve uma combinação de eventos predisponentes: uso prolongado das lentes de contato; hábitos incorretos de higiene pessoal; limpeza ineficaz e/ou com produtos inadequados das lentes e dos estojos de lentes; exposição à água contaminada com a ameba e microlesões na córnea (SIDDIQUI; KHAN, 2012).

**Figura 3 – Visão de trofozoítos de *Acanthamoeba* ao microscópio eletrônico de varredura. A) Grande número de acantopódios na superfície; B) *Acanthamoeba* ligando-se às células epiteliais da córnea.**



Legendas: a, ameba; e, epitélio.  
Fonte: adaptado de Khan (2006).

Uma vez com a doença, surgem sintomas como vermelhidão, dor local, fotofobia, edema e lacrimejamento, além de possíveis infecções bacterianas secundárias. Sendo assim, o diagnóstico é frequentemente confundido com outras fontes de contaminação, como fungos, vírus e bactérias, levando a um tratamento incorreto e uma piora no quadro (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). No entanto, um sinal indicativo de *Acanthamoeba*, é a presença de úlcera de córnea de difícil cicatrização (VISVERVARA; SCHUSTER, 2007).

Existem tratamentos tópicos disponíveis à base da combinação de isetionato de propamidina, neomicina ou clorexidina, tendo em vista que terapias combinadas demonstram maior taxa de sucesso se comparadas a terapias individuais, quando na

forma de cistos, as amebas mostram-se bastante resistentes (SIDDIQUI, 2022; KHAN, 2012), e conseqüentemente a terapêutica necessita ser prolongada, mantida entre 6 e 12 meses, ou mais. Na maioria dos casos, o diagnóstico efetuado refere-se à presença de herpes, fungos e bactérias, fazendo com que a presença da ameba seja apenas detectada através de raspado ou biópsia da córnea ou então, com a remoção do órgão (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

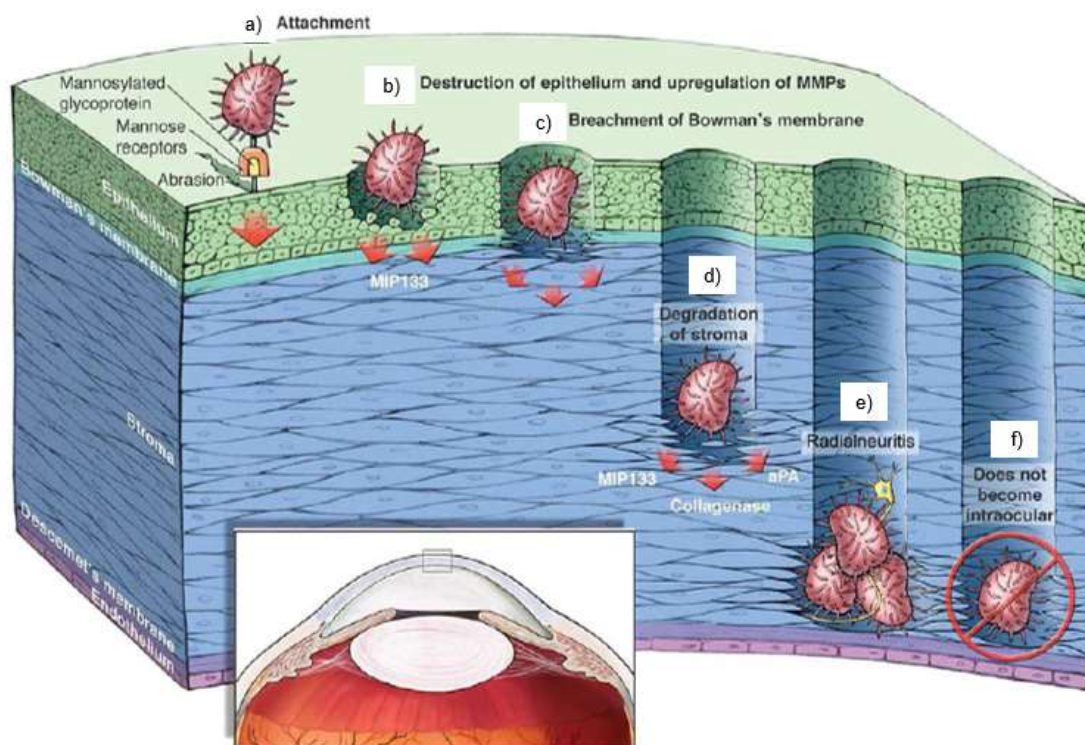
#### 2.2.5 Patogênese e fatores de virulência

Após a introdução no órgão e, a partir de proteínas de ligação à manose presentes na membrana do trofozoíto, a ameba se liga às glicoproteínas de manose no epitélio da córnea, iniciando assim, o processo de adesão celular. Esta exposição à manose leva os trofozoítos a liberarem MIP133 (uma protease de 133kDa, denominada Proteína Induzida por Manose), que exerce efeito altamente citolítico nas células da córnea.

Após a ligação inicial, ocorrem então diversos eventos secundários, como fagocitose e produção de toxinas, dependentes da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (CLARKE, 2006). Com isso, há destruição do epitélio e inicia-se o processo de invasão com o rompimento da membrana de *Bowman* (camada fina e acelular com função de barreira, sob o epitélio) e, posteriormente, a degradação do estroma (camada mais larga da córnea, composta essencialmente de colágeno).

Este processo induz os trofozoítos a produzirem ainda mais proteases e enzimas, além da MIP133, como collagenases, serinoproteases, metaloproteases, elastases, fosfolipases, entre outras, incluindo um ativador de plasminogênio, levando a uma extensa destruição desta camada (Figura 4).

Figura 4 – Esquema resumido da patogênese de *Acanthamoeba* na ceratite.



Legenda: a) Adesão pelos receptores de manose do epitélio da córnea; b) invasão e destruição do epitélio pela indução da MIP-133, liberada pelos trofozoítos; c) rompimento da membrana de Bowman; d) produção de colagenase e destruição do estroma; e) agrupamento de trofozoítos ao redor dos nervos da córnea, levando à ceratoneurite radial e dor intensa; f) limitação da infecção, que raramente progride para o endotélio.

Fonte: adaptado de Clarke (2006).

A MIP133 parece ser a peça-chave na patogênese da ceratite por *Acanthamoeba*, devido à indução de apoptose das células epiteliais e dos ceratócitos, principalmente pela via de ação da caspase-3 (CARNT, 2015). Posteriormente ao processo de invasão e destruição das camadas celulares, as células amebianas podem se agrupar ao redor dos nervos da córnea, produzindo uma ceratoneurite radial, o que explica a dor intensa. Geralmente a infecção é autolimitante, entretanto, raramente pode progredir para além do endotélio da córnea (CLARKE, 2006).

Essas enzimas possuem significativo potencial de exercer papel como alvos terapêuticos e/ou de imunodiagnóstico, entretanto, o entendimento mais preciso dos seus mecanismos de ação a nível molecular ainda está começando a surgir (SIDDIQUI; KHAN, 2012). Pode-se dizer, de maneira geral, que estas ferramentas de patogênese da ceratite são complexas e em processo de elucidação, envolvendo

fatores tanto do microrganismo, quanto do hospedeiro e que necessitam ser explorados.

#### 2.2.6 Resposta imune

Existem poucos dados disponíveis na literatura científica acerca dos mecanismos da resposta imune dos hospedeiros frente a infecções por *Acanthamoeba* spp., porém alguns estudos indicam que estas amebas são capazes de induzir tanto a resposta imune inata, quanto a adaptativa (SIDDIQUI; KHAN, 2012; KOT, 2018). Devido à natureza quase que onipresente de *Acanthamoeba* com sua extensa distribuição ambiental, é possível afirmar que todos os indivíduos invariavelmente já entraram em contato com este protozoário, estando sempre em constante exposição. É comum, portanto, que sejam encontrados em indivíduos saudáveis e assintomáticos formas ativas em cultivos a partir de coletas orais ou nasofaríngeas. Da mesma forma, a presença de anticorpos contra *Acanthamoeba* em exame sorológico torna este método sem valor diagnóstico (KHAN, 2006; LORENZO-MORALEZ, 2015, MARCIANO-CABRAL, 2003).

Segundo estudo realizado no ano de 2009, entre indivíduos de 37 países diferentes, a prevalência geral de anticorpos para *Acanthamoeba* spp. foi consideravelmente alta (87,7%), com níveis semelhantes em ambos os sexos (89,2% em mulheres e 86,2% em homens), ou seja, a grande maioria das pessoas, nas mais variadas regiões geográficas, possui naturalmente anticorpos contra esta ameba, confirmando o seu caráter ubíquo (KOT *et al*, 2021; BRINDLEY, 2009). Não se sabe ao certo, porém, quais os mecanismos envolvidos na resposta imune para a eliminação do microrganismo nestas “infecções” transitórias (MARCIANO-CABRAL, 2003).

No olho, o filme lacrimal (lágrima) possui em sua composição diversas moléculas antimicrobianas que estão em constante ação frente a uma ampla gama de ameaças ambientais ou infecciosas que entram em contato com os olhos rotineiramente. Entre estas moléculas, estão as IgA, anticorpo mais abundante nos mamíferos, capazes de fornecer uma alta proteção contra *Acanthamoeba* spp. nos estágios iniciais da infecção (NIEDERKON, 2021). Porém, apesar da produção e presença destes anticorpos, a resposta imune adaptativa não é capaz de montar uma

imunidade protetora frente a novas infecções, por isso a reincidência de casos é tão presente (NIEDERKON, 2002). Além disso, em estudo prévio, foram verificados baixos níveis séricos de IgA e IgG em pacientes que produziram ceratite por *Acanthamoeba* spp. (NEELAM & NIEDERKORN, 2017).

A resposta imune inata, por sua vez, gera uma rápida ação perante a invasão dos trofozoítos, através de moléculas reconhecedoras de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), presentes na membrana celular dos microrganismos. Apesar de não ser uma resposta específica, a partir desses PAMP o sistema imune consegue distinguir a natureza de cada agente. Os principais envolvidos nesta resposta são os macrófagos e os neutrófilos, sendo que os macrófagos ao serem ativados, liberam diversas citocinas pró-inflamatórias como interleucina 12 (IL-12), quimiocinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que podem levar à eliminação do patógeno e à resolução da inflamação (MATTANA *et al.*, 2016).

Este amplo espectro de respostas e reações inflamatórias pode variar nos pacientes, gerando sintomas clínicos de leves a severos, incluindo quadro de infecção grave da córnea, podendo chegar, inclusive, a inflamações e complicações extracorneanas como esclerite (inflamação da esclera), embora estas não se relacionem diretamente com a invasão do microrganismo. Com isso, ao expandir os conhecimentos acerca da resposta imune do hospedeiro e, através de um tratamento mais personalizado, melhores resultados poderão ser obtidos, juntamente com o desenvolvimento de novas terapêuticas (CARNT, 2016).

O que se pode concluir até o momento, é que os fatores determinantes que permitem que a doença se desenvolva estão relacionados tanto ao patógeno, quanto ao hospedeiro, embora sejam necessários mais estudos para um melhor aprofundamento sobre este tema (LORENZO-MORALES, 2015).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho objetiva estabelecer um novo modelo *in vivo* utilizando moscas *D. melanogaster* para estudos da virulência e terapêutica das infecções causadas por AVL do gênero *Acanthamoeba*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a mortalidade de moscas *D. Melanogaster wild-type* (WT) e *Toll*-deficientes infectadas por *Acanthamoeba* spp. por via oral e por punção traumática no tórax;
- Verificar a viabilidade de *Acanthamoeba* spp. por recultivo em placas de Petri com ágar não nutriente (ANN) após inoculação;
- Analisar a extensão e presença de *Acanthamoeba* spp. no tecido das moscas através de exame histológico;
- Confirmar a infecção por *Acanthamoeba* em *D. melanogaster* utilizando técnica de biologia molecular por exame de reação em cadeia da polimerase (PCR).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS-UFRGS), no Laboratório de Experimentação em *Drosófila* (Drosolab), pertencente ao Departamento de Farmacologia, em conjunto com o Laboratório de Protozoologia, pertencente ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

### 4.1 ESTOQUE DE *Drosophila melanogaster*

As moscas foram mantidas no laboratório a uma temperatura constante de 25 °C e controle de luz-escuro 12/12 h. Permaneceram em tubos contendo alimento preparado com ágar bacteriológico 1%, fermento biológico 1%, leite em pó 1%, açúcar 2%, conservante metilparabeno 0,1% e água destilada. São realizados cruzamentos diários para manutenção do estoque e, quando os tubos completam 30 dias, é feito o descarte das moscas. As cepas foram doadas pelo professor Dr. Dimitrios Kontoyiannis, da Universidade do Texas, Estados Unidos. Foram utilizadas moscas *wild-type* (WT, selvagens), do tipo Oregon *R*, e moscas *Toll*-deficientes originárias a partir de cruzamentos de moscas carregando um alelo termossensível de *Toll* ( $TI^{R632}$ ) com moscas carregando um alelo nulo de *Toll* ( $TI^{I-RXA}$ ) (LIONAKIS *et al.*, 2005; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007).

### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizados três experimentos independentes com AVL do gênero *Acanthamoeba* em *D. melanogaster* através da inoculação em duas vias (punção traumática com agulha estéril e via oral pelo alimento). Após os procedimentos de inoculação, foi realizado o acompanhamento diário de mortes por sete dias consecutivos, sendo que nos dias 3, 5 e 7 as moscas mortas foram coletadas para recultivo em placas de Petri e/ou conservação em solução de formaldeído 1% para posterior exame histológico.

As moscas utilizadas foram fêmeas *Toll*-deficientes e fêmeas virgens WT, com idade média de 2 a 4 dias de vida. Com cerca de 10 a 12 moscas em cada pote, a

separação dos grupos de acordo com a via de inoculação e linhagem de *Drosophila* dispôs-se da seguinte forma:

- WT via punção: seis grupos inoculados e três grupos controle;
- WT via oral: seis grupos inoculados e três grupos controle;
- *Toll*-deficientes via punção: seis grupos inoculados e três grupos controle;
- *Toll*-deficientes via oral: seis grupos inoculados e três grupos controle.

#### 4.3 CULTIVO DE *Acanthamoeba* SPP.

As amebas, oriundas do Laboratório de Protozoologia, foram mantidas em cultura axênica em estufa a 30 °C em garrafas de cultivo celular com meio líquido PYG (proteose-peptona, levedura e glicose), acrescido de antibióticos (penicilina G potássica, 400 UI/ml e estreptomicina, 400 µ/ml), trocado de duas a três vezes por semana. Repiques para ampliação do estoque foram feitos, conforme necessidade, no decorrer do trabalho. Foi utilizado o isolado clínico de *Acanthamoeba* spp. (genótipo T4) oriunda de raspado de córnea de paciente do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, já mantida em estoque no laboratório.

#### 4.4 PREPARO DO INÓCULO CONCENTRADO DE CÉLULAS

Em capela de fluxo laminar, o meio PYG das garrafas foi descartado e 1 ml de PBS foi adicionado em cada uma. Para soltar a camada de células da superfície interna, foi feito um jateamento com a micropipeta por 4-5 vezes seguidas. Após, o conteúdo foi coletado para um tubo Falcon e centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e 2 ml de PBS foram adicionados e a centrifugação foi repetida após homogeneização. Novamente, o sobrenadante foi descartado, 3 ml de PBS foram adicionados e realizou-se homogeneização para soltar o *pellet* de células. Em seguida, foi feita a contagem de células na câmara de Neubauer. A concentração alcançada no decorrer deste trabalho manteve-se em 10<sup>6</sup> trofozoítos por ml.



## 4.5 INOCULAÇÕES

Em ambas as vias de inoculação, utilizou-se anestesia com gás carbônico (CO<sub>2</sub>) para a manipulação das moscas.

### 4.5.1 Inoculação via oral

Para esta via, o alimento é o mesmo citado no item 4.1, porém foi utilizado ágar semissólido à 0,5% para facilitar a mobilidade das amebas. Sobre esse, foram adicionados 100 µl do inóculo preparado e, para os grupos controle, 100 µl de PBS. Realizou-se o repouso do material em estufa a 30 °C por 2 horas para absorver e, então, as moscas foram inseridas nos potes. Essas foram submetidas a um período de jejum prévio por 4 a 6 h em frascos sem alimento. A mortalidade das moscas foi avaliada diariamente por sete dias.

### 4.5.2 Inoculação via punção

O procedimento é realizado mergulhando uma agulha estéril (tamanho 000) no microtubo contendo o inóculo e, em seguida, é feita uma leve perfuração, na região torácica, perto da base da asa da mosca (Figura 5). Para os grupos controle, o mesmo processo foi realizado utilizando PBS. Após aguardar 4 h para observação de possíveis perdas devido ao método, o número amostral de cada pote foi ajustado, subtraindo as moscas mortas neste intervalo. A mortalidade das moscas foi avaliada diariamente por sete dias.

**Figura 5 – Demonstração do procedimento de inoculação por via punção traumática na região lateral do tórax, próximo à base da asa.**



Fonte: a própria autora (2022).

#### 4.6 PLAQUEAMENTO EM ÁGAR NÃO NUTRIENTE (ANN)

Nos dias 3, 5 e 7, as moscas mortas foram coletadas e, após passarem por uma sequência de três lavagens com PBS, foram maceradas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Em seguida, 100 µl do pellet foram adicionados no centro da placa de Petri contendo meio ANN (ágar bacteriológico 1,5% com sobrecamada de *Escherichia coli* inativada termicamente), e então estas placas foram incubadas em estufa a 30 °C. Após aguardar no mínimo 48 horas para o crescimento, foi realizada a análise das mesmas em microscópio óptico (aumento de 100x) para verificação, de maneira qualitativa, do crescimento e recuperação das células amebianas, caso houvesse.

#### 4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Em busca de uma melhor visualização da infecção no tecido das drosófilas, parte das moscas mortas coletadas foi encaminhada para análise histológica no Laboratório Axys (Porto Alegre, RS), onde foram realizados processos de fixação em formol 10% tamponado, impregnação em blocos de parafina, corte de lâminas e coloração com hematoxilina e eosina.

## 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Curvas de sobrevivência foram criadas a partir do método de Kaplan-Meier, e diferenças entre os grupos compostos por moscas WT e *Toll*-deficientes infectadas e seus respectivos controles foram analisados através do teste de log-rank, utilizando o programa GraphPad Prism (versão 6.01). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados para significância estatística.

## 4.9 IDENTIFICAÇÃO POR BIOLOGIA MOLECULAR

Objetivando confirmar a infecção através de biologia molecular, foi realizada a extração de DNA das amostras, seguido de verificação da presença de material genético por eletroforese em gel de agarose para, posteriormente, seguir com a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), todos estes processos executados no Laboratório de Protozoologia.

### 4.9.1 Extração de DNA das amostras

As moscas (uma amostra de cada grupo) foram maceradas e adicionou-se 500  $\mu$ l de buffer de extração (100 mM TRIS pH 8,3; 10 mM EDTA pH 7,5; 200 mM NaCl; 1% SDS), seguido de 3  $\mu$ l de proteinase K em cada. As amostras então foram incubadas em banho seco a 65 °C por duas horas. Após, seguiu-se com o protocolo de extração segundo o kit comercial Kasvi.

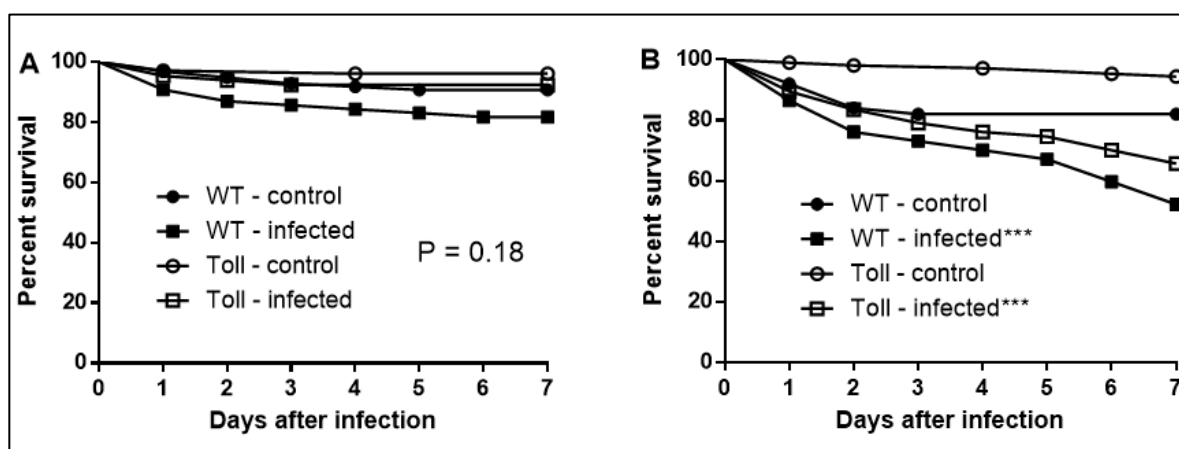
### 4.9.2 Eletroforese em gel de agarose

Para a confirmação da presença de DNA nas amostras, foi realizada a visualização de bandas em gel de agarose 0,8 % em um aparelho foto documentador com luz UV, após processo de eletroforese.

## 5 RESULTADOS

Na infecção pela via oral, para ambos os grupos, a taxa de mortalidade não foi significativa ( $p > 0,05$ ), com valores de 18% para as moscas WT e 8% para as *Toll*-deficientes (Figura 6A). Já nas inoculações por punção traumática, as drosófilas se mostraram suscetíveis à infecção por amebas do gênero *Acanthamoeba* spp. (Figura 6B), sendo que as moscas do grupo WT apresentaram uma taxa de mortalidade mais elevada, em torno de 48% ( $p < 0,001$  em comparação ao respectivo grupo controle), enquanto no grupo *Toll*-deficiente este valor ficou em aproximadamente 35% ( $p < 0,001$  em comparação ao respectivo grupo controle). Com isso, pôde-se perceber uma maior capacidade de virulência e infectividade da via por punção com agulha, em comparação à via oral pelo alimento.

**Figura 6 – Curvas de sobrevivência de moscas *D. melanogaster* wild-type (WT) e *Toll*-deficientes (*Toll*) infectadas por *Acanthamoeba* spp. por via oral (A) ou por punção traumática no tórax (B).**



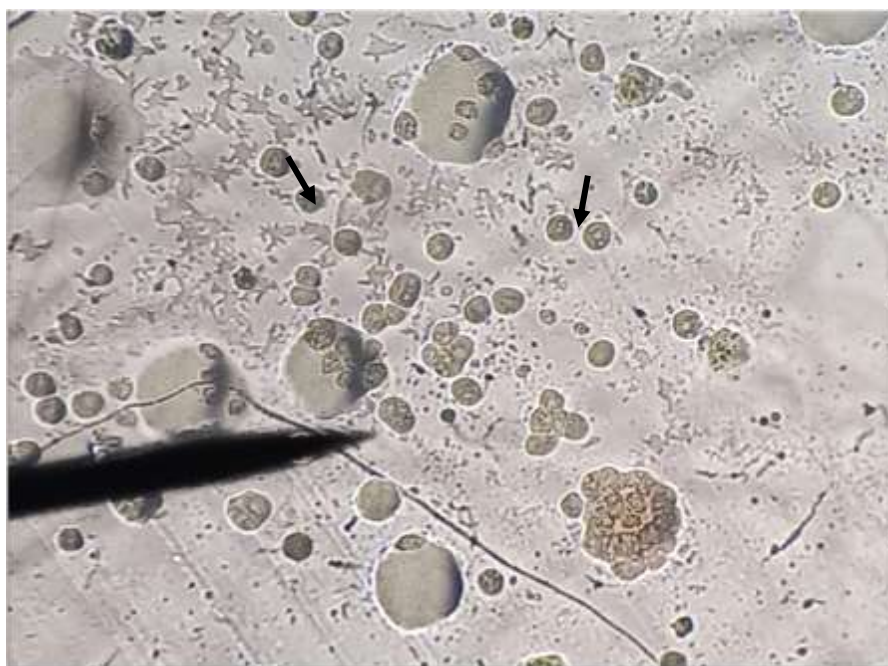
Legenda: Dados correspondem a três experimentos independentes (sem diferenças significativas entre repetições;  $p > 0,05$ , teste de log rank). \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao respectivo grupo controle (PBS estéril).

Após o recultivo em ANN, foi obtida a recuperação de células viáveis de *Acanthamoeba* spp. tanto no grupo WT quanto no grupo *Toll*-deficiente da via por punção (Figura 7), nos três dias coletados (3, 5 e 7). Em contrapartida, os cultivos dos grupos da via oral não apresentaram crescimento relevante, sendo quase nulos.

Em relação à análise histológica, foi possível observar a presença de trofozoítos em meio ao tecido em diversas regiões do corpo da mosca, tanto do grupo

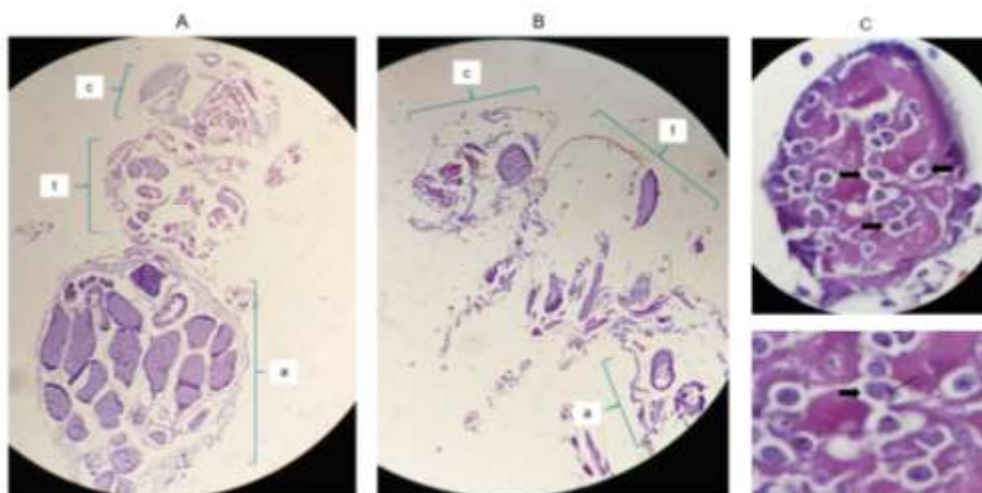
*Toll*, quanto do grupo WT (Figura 8), fato não verificado em lâminas com moscas do grupo controle.

**Figura 7 - Placa de ANN com recultivo de moscas maceradas apresentando trofozoítos viáveis de *Acanthamoeba* (setas).**



Legenda: Esta placa refere-se a um grupo WT punção coletado no dia 3 após inoculação. Aumento de 100x.

**Figura 8 - Corte histológico de mosca WT do grupo controle (A) e de mosca WT inoculada via punção (B); Trofozoítos em meio ao tecido (C).**



Legenda: a) abdômen; c) cabeça; t) tórax; Em C, presença de trofozoítos em meio ao tecido (setas) onde percebe-se o núcleo evidente (linha). A e B em aumento de 100x; C em aumento de 1000x, seguido de 1000x com ampliação digital.

A partir da leitura das amostras no gel de agarose, foram obtidos resultados inconclusivos, provavelmente por pouca presença de material genético, desta forma, não foi possível avançar para a realização da técnica de PCR neste trabalho.

## 6 CONCLUSÕES

Os experimentos de inoculação de *Acanthamoeba* spp. no modelo experimental da mosca-das-frutas *D. melanogaster*, procedimento até então inédito, foram promissores. O razoável índice de mortalidade durante os sete dias de observação, bem como a presença de trofozoítos viáveis no recultivo em placas com ANN e nas lâminas histológicas, indicam a suscetibilidade da drosófila à infecção por este microrganismo, o que permite abrir caminhos para futuros estudos de resposta imune e terapêutica.

Sendo assim, conclui-se que a mosca *D. melanogaster* possui potencial de se estabelecer futuramente como modelo alternativo de estudos e prospecção de fármacos frente a infecções por AVL do gênero *Acanthamoeba*.

## 7 PERSPECTIVAS

A continuidade dos estudos é essencial, a fim de se obter informações mais amplas e abordar mais itens, como os fatores de virulência envolvidos, mecanismos de escape da resposta imune e tecidos invadidos. Da mesma forma, é interessante que haja uma ampliação dos testes para uma maior variedade de cepas clínicas e/ou ambientais de *Acanthamoeba* spp. incluindo, se possível, a identificação e caracterização das espécies através de técnicas de sequenciamento genético. Além disso, é de grande valia também executar testes quantitativos de parasitemia através da coleta de hemolinfa de moscas infectadas, além de ampliar o período de observação pós-inoculação para coletar dados também de moscas sobreviventes.

Ainda não estão muito bem expostos quais foram os mecanismos que levaram às diferenças nas mortalidades entre as linhagens das moscas estudadas, com isso também é necessária uma maior exploração dos estudos em relação às diferenças na resposta imune das drosófilas, em busca de melhores esclarecimentos neste assunto.

Com a possibilidade de estabelecer a *D. melanogaster* como modelo alternativo frente a estas infecções por AVL, será possível ampliar e aprofundar uma ampla gama de estudos necessários para o entendimento das patogenias, bem como prospectar novos protocolos terapêuticos a partir de testes com fármacos sozinhos ou em combinação.



## REFERÊNCIAS

ADAMS, M. D. *et al.* The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, n. 24, p. 2185-2195, 2000.

APIDIANAKIS, Y. *et al.* Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. **Eukaryotic Cell**. v. 3, n. 2, p. 413-419, 2004.

APIDIANAKIS, Y.; RAHME, L. G. *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Nature Protocols**. v. 4, n. 9, p. 1285-1294, 2009.

ASHBURNER, M.; BERGMAN, C. M. *Drosophila melanogaster*. A case study of a model genomic sequence and its consequences. **Genome Research**, p. 1661-1667, 2005.

BALLS, M. It's time to reconsider the principles of humane experimental technique. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 48, n. 1, p. 40-46, 2020.

BEN-AMI, R. *et al.* *Drosophila melanogaster* as a model to explore the effects of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain type on virulence and response to linezolid treatment. **Microbial Pathogenesis**, v. 55, p. 16-20, 2013.

BETANZOS, A.; BAÑUELOS, C.; OROZCO, E. O. Host invasion by pathogenic amoebae: epithelial disruption by parasite proteins. **Genes**, v. 10, n. 618, 2019.

BRINDLEY, N; MATIN, A; KHAN, N. A. *Acanthamoeba castellanii*: High antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. **Experimental Parasitology**, v. 121, n.3, p. 254–256, 2009.

CARNT, N.; STAPLETON, F. Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: a review. **Ophthalmic & Physiological Optics**, v. 36, n. 2, p. 77-92, 2015.

CARTON, Y; NAPPI, A. J. *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. **Parasitology Today**, v. 13, n. 6, p. 218-227, 1997.

CHAMILOS, G. *et al.* *Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 193, n. 7, p. 1014-1022, 2006.

CHAMILOS, G. *et al.* *Drosophila melanogaster* as a model host to dissect the immune pathogenesis of zygomycosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 105, n. 27, p. 9367-72, 2008.

CHYB, S.; GOMPEL, N. **Atlas of *Drosophila* morphology: Wild-type and classical mutants**. Oxford, UK: Academic Press, 2013.

CLARKE, D. W.; NIEDERKORN, J. Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba* Keratitis. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 175-180, 2006.

CORSARO, D. Update on *Acanthamoeba* phylogeny. **Genetics, Evolution, and Phylogeny**, v. 119, n. 10, p. 3327-3338, 2020.

CORSARO D. *et al.* Update on *Acanthamoeba jacobsi* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. **Parasitology Research**, p. 1273–1284, 2017.

CC, S. *et al.* Insect *in vitro* system for toxicology studies - current and future perspectives. **Frontiers in Toxicology**, v. 3, n. 671600, 2021.

DEPARTMENT OF GENETICS UNIVERSITY OF LEICESTER. **The Fly Manual**. Leicester, Reino Unido, 2022. Disponível em: <https://www2.le.ac.uk/departments/genetics/research/staff-research-interests/tauber-research-lab/livegene/fly-manual-1/view>. Acesso em: março, 2022.

GELMAN, B. *et al.* Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. **Jama**, v. 285, n. 9, p. 2450-2451, 2001.

GUIMARAES, A. J. *et al.* *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. **Microbiological Research**, p. 30-38, 2016.

HIROYASU, A; DEWITT, D; GOODMAN, A. Extraction of hemocytes from *Drosophila melanogaster* larvae for microbial infection and analysis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 135, e. 57077, 2018.

HULTMARK, D. *Drosophila* immunity: paths and patterns. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, n. 1, p. 12-19, 2003.

JAHANGEER, M. *et al.* *Naegleria fowleri*: sources of infection, pathophysiology, diagnosis, and management; a review. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 47, n. 2, p. 199–212, 2020.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 564–595, 2006.

KOT, K; LANOCHA-ARENDARCZYK, N; KOSIK-BOGACKA, D. Immunopathogenicity of *Acanthamoeba* spp. in the brain and lungs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1261, 2021.

LAMARIS, G. A. *et al.* Virulence studies of *Scedosporium* and *Fusarium* species in *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 12, p. 1860-1864, 2007.

LAU, W. G. *et al.* The *Drosophila melanogaster* toll pathway participates in resistance to infection by the gram-negative human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **American Society for Microbiology Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 4059-4066, 2003.

LAYLA, M. *et al.* Global *Drosophila* Research: a bibliometric analysis. **Drosophila Information Service**, n. 93, p. 232-242, 2010.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. **The Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 697-743, 2007.

LIONAKIS, M. S. *et al.* Toll-deficient *Drosophila* flies as a fast, high-through put model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* virulence. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 7, p. 1188-1195, 2005

LORENZO-MORALES, J. *et al.* Is *Balamuthia mandrillaris* a public health concern worldwide? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 10, 2013.

MACIVER, S. K. *et al.* Is *Naegleria fowleri* an emerging parasite? **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 19-28, 2020.

MARCIANO-CABRAL, F., CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 273–307, 2003.

MARRA, A. *et al.* *Drosophila* antimicrobial peptides and lysozymes regulate gut microbiota composition and abundance. **American Society for Microbiology**, v. 12, n. 4, 2021.

MATTANA, A. *et al.* *Acanthamoeba castellanii* Genotype T4 Stimulates the production of interleukin-10 as well as proinflammatory cytokines in THP-1 cells, human peripheral blood mononuclear cells, and human monocyte-derived macrophages. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 10, p. 2953–2962, 2016.

MIZIARA, I. D. Research ethics in animal models. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 78, n. 2, p. 128-131, 2012.

NEELAM, S; NIEDERKORN, J. Y. Pathobiology and Immunobiology of *Acanthamoeba* Keratitis: Insights from Animal Models. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 2, p. 261-268, 2017.

NIEDERKORN, J. Y. The role of the innate and adaptive immune responses in *Acanthamoeba* keratitis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 50, n. 1, p. 53-59, 2002.

NIEDERKORN, J. Y. The biology of *Acanthamoeba* keratitis. **Experimental Eye Research**, v. 202, 2021.

OH, C. *et al.* *Drosophila melanogaster* model for *Mycobacterium abscessus* infection. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 12, p. 788-795, 2013.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews**. v. 63, n. 411, p. 411-436, 2011

PARSONS, B.; FOLEY, E. Cellular immune defenses of *Drosophila melanogaster*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 58, p. 95-101, 2016.

PELTAN, A. *et al.* Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Leishmania donovani*. **Plos One**, v. 7, n. 12, 2012.

PEREIRA, A.; PEREZ, M. Amebas de vida livre. **Offarm**, n .6, p. 114-117, 2003.

PONTES RÉGIS, A. H.; CORNELLI, G. Experimentação animal: panorama histórico e perspectivas. **Revista Bioética**, v. 20, n. 2, p. 232-243, 2012.

PRESGRAVES, O. A. F. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. *In*: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Orgs.) **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2002. p. 361-367.

PRETZEL, J. *et al.* Antiparasitic Peptides. *In*: Vilcinskas, A. (eds) Yellow Biotechnology I. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, vol 135. Springer, Berlin, Heidelberg. 2013. [https://doi.org/10.1007/10\\_2013\\_191](https://doi.org/10.1007/10_2013_191)

PUSSARD, M; PONS, R. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**, n. 13, p. 557-598, 1977.

ROBERTS, D. B. *et al.* Mutant analysis reveals an alternative pathway for N-linked glycosylation in *Drosophila melanogaster*. **European Journal of Biochemistry**, v. 253, n. 2, p. 494-498, 1998.

SACKTON, T. B. *et al.* Dynamic evolution of the innate immune system in *Drosophila*. **Nature Genetics**, v. 39, n. 12, p. 1461–1468, 2007.

SCHNEIDER, D.; SHAHABUDDIN, M. Malaria parasite development in a *Drosophila* model. **Science**, v. 288, n. 5475, p. 2376-2379, 2000.

SCHUSTER, F. L. *et al.* Under the radar: *Balamuthia* amebic encephalitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 7, p. 879-887, 2009.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasites & Vectors**, v.5, n. 6, 2012.

SIDDIQUI, R. *et al.* Novel Plant-Based metabolites as disinfectants against *Acanthamoeba castellanii*. **Antibiotics**, v. 11, n. 248, 2022.

STEPHENSON, R; METCALFE, N. H. *Drosophila melanogaster*: a fly through its history and current use. **The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 43, n. 1, p. 70-75, 2013.

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

TROHA, K., BUCHON, N. Methods for the study of innate immunity in *Drosophila melanogaster*. **Wires, Developmental Biology**, v. 8, n. 5, 2019.

TONK, M. *et al.* The *Drosophila melanogaster* antimicrobial peptides Mtk-1 and Mtk-2 are active against the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Research**, v. 118, n. 6, p. 1993-1998, 2019.

VISVESVARA, G. Infections with free-living amebae. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 114, n. 10, p. 153-168, 2013.

VISVESVARA, G; MOURA, H.; SCHUSTER, F. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. **Immunology & Medical Microbiology**, v. 50, n. 1, 2007.

VISVESVARA, G.; SCHUSTER, F. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. **Drug Resistance Updates**, p. 41-51, 2004.

WILSON, D. N.; CATE, J. H. D. The structure and function of the eukaryotic ribosome. **Cold Spring Harbor Laboratory**, v. 4, n. 5, 2012.

YAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, H. *Drosophila* as a model organism. *In*: YAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, H. ***Drosophila Models for Human Diseases***, v. 1076, p. 1-10, 2018.

YOUNES, S., *et al.* *Drosophila* as a model organism in host–pathogen interaction studies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. 214, 2020.

ZANETTE, R. A. *et al.* *Toll*-deficient *Drosophila* is susceptible to *Pythium insidiosum* infection. **Microbiology and Immunology**, v. 57, n. 10, p. 732-735.