

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE ISOLADOS
AMBIENTAIS E CEPAS PADRÃO DE *ACANTHAMOEBA* SPP. E SUA RELAÇÃO
COM A PATOGENICIDADE *IN VIVO***

Dissertação de Mestrado

Carolina De Marco Veríssimo

Porto Alegre, 2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE ISOLADOS
AMBIENTAIS E CEPAS PADRÃO DE *ACANTHAMOEBA* SPP. E SUA RELAÇÃO
COM A PATOGENICIDADE *IN VIVO***

Carolina De Marco Veríssimo
Biomédica – IPA

Dissertação de Mestrado apresentada como um dos
pré-requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente
Orientador(a): Marilise Brittes Rott

Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil
Março de 2012.

CIP - Catalogação na Publicação

Veríssimo, Carolina De Marco
CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE
ISOLADOS AMBIENTAIS E CEPAS PADRÃO DE ACANTHAMOEBA
SPP. E SUA RELAÇÃO COM A PATOGENICIDADE IN VIVO /
Carolina De Marco Veríssimo. -- 2012.
90 f.

Orientadora: Marilise Brittes Rott.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2012.

1. Acanthamoeba. 2. Proteases. 3. Patogenicidade
in vivo. I. Rott, Marilise Brittes, orient. II.
Título.

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

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo preciso agradecer minha família, minha mãe Alice, meu pai Humberto, meus amados irmãos Beto, Alexandre, Felipe e Camila, meus queridos irmãos de coração, Thalita, Jéssica, Líli e Renan, minha afilhada Duda, que sempre foram imparciais em me apoiar, em acreditar e com quem eu pude contar nos bons e maus momentos, antes e ao longo do mestrado e certamente pessoas com quem sempre contarei. Não tenho como descrever o quanto vocês são importantes e qual é o tamanho do meu amor por vocês. Obrigada por tudo sempre!

À minha querida orientadora, Prof^a. Marilise, por ter aceitado me orientar neste trabalho, pela amizade, por me apoiar, me ensinar e confiar em minhas idéias e na minha capacidade de realizá-las. Quem dera todos os orientadores fossem assim!

Aos queridos amigos que conquistei ao longo destes dois anos de mestrado e que, do fundo do coração, espero que sigam pra sempre na minha vida: Ana Maris, Lua, Ismael, Mari Aline, Dayane, Vini, Éder, Jú, Ana Paula, Daniel, Volt, Renata, Cibele, Jamile, Kendi, Stela, Fê Lopes. Sem vocês muitas coisas não teriam dado certo, talvez nem tivessem acontecido. Vocês tornaram tudo mais fácil, mais leve, mais engraçado e de quebra ainda me ensinaram muito. Obrigada pelos cafés, “reuniões”, papos, desabafos, danças, cevas em finais de tarde, teatros, dicas, ajuda, protocolos, risadas, meios preparados, material autoclavado, parceria, amizade, confiança e tantas outras coisas!

Ao pessoal da Parasito-UFRGS, todos os professores e funcionários, por estarem sempre disponíveis.

Aos funcionários e professores do PPGMAA que sempre estiveram disponíveis. Ao professor Adriano Brandelli pela atenção e explicações.

Aos queridos Jaque Carletti, Gean, Marília, João, Priscila, Márcia, Giba, Dudu, Rafael Maurer, Alessandra, agradeço pelo incentivo, pela amizade e ajuda de sempre.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE ISOLADOS AMBIENTAIS E CEPAS PADRÃO DE *ACANTHAMOEBA* SPP. E SUA RELAÇÃO COM A PATOGENICIDADE *IN VIVO*

Autor: Carolina De Marco Veríssimo
Orientador(a): Marilise Brittes Rott

RESUMO

O conhecimento a respeito dos fatores que de fato definem a patogenicidade de *Acanthamoeba* é limitado. A atividade proteolítica apresentada por isolados de *Acanthamoeba* tem sido associada a funções importantes na patogênese de doenças como ceratite e encefalite granulomatosa amebiana. O presente trabalho avaliou os perfis de atividade proteolítica de meios condicionados de *Acanthamoeba* isoladas de casos clínicos e do ambiente em gel de zimograma, com o objetivo de caracterizar as proteases secretadas e relacioná-las à capacidade patogênica apresentada pelos isolados nos testes *in vivo* e *in vitro*. Os isolados avaliados secretaram quantidades e tipos de proteases diferentes entre si, as quais não foram associadas à origem do isolado, genótipo ou espécie e nem à patogenicidade *in vivo* de *Acanthamoeba*. Os modelos *in vivo* aplicados foram úteis para avaliar a capacidade do mesmo isolado em estabelecer infecções uculares olhos e sistêmicas e diferenciar os isolados quanto ao grau de virulência. Além disso, demonstramos que cepas de origem ambiental são capazes de estabelecer infecções oculares e sistêmicas em animais, destacando o risco que estes protozoários podem oferecer à saúde humana. Em conjunto, nossos dados indicam que, apesar de importantes, testes fenotípicos e genotípicos para verificar diferenças entre isolados não podem prever a virulência dos mesmos, sendo necessário associar estes dados a testes *in vivo*.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (90 p.) – Março de 2012.

CHARACTERIZATION OF THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF ENVIRONMENTAL ISOLATES AND STANDARD STRAINS *ACANTHAMOEBA* SPP. AND ITS RELATIONSHIP WITH PATHOGENICITY *IN VIVO*

Author: Carolina De Marco Veríssimo
Advisor: Marilise Brittes Rott

ABSTRACT

The knowledge about the factors that determine the pathogenicity of *Acanthamoeba* is limited. The proteolytic activity presented by *Acanthamoeba* isolates has been associated with important roles in the pathogenesis of diseases such as keratitis and granulomatous amoebic encephalitis. This study evaluated the profiles of proteolytic activity of *Acanthamoeba*-conditioned medium from clinical and environmental isolates in zymogram gels, in order to characterize the proteases secreted and relate them to the pathogenic capacity demonstrated by the isolated in *in vitro* and *in vivo* tests. The isolates secreted different amounts and types of proteases, which were not associated with the source of the isolate genotype or species, and *in vivo* pathogenicity of the *Acanthamoeba*. The *in vivo* models applied were useful to evaluate the ability of the same strain to establish systemic and eye infections, and to differentiate them in the degree of virulence. Furthermore, we demonstrated that isolates of environmental origin are able to establish ocular and systemic infections in animals, highlighting the risk that this protozoan can offer to human health. Furthermore, our data indicate that, despite important, phenotypic and genotypic tests for detecting differences between isolates cannot predict the virulence of the *Acanthamoeba*, being necessary to link these data to *in vivo* tests.

¹Master Dissertation in Agriculture and Environmental Microbiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (90 p.) – March, 2012.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	02
2.1. Gênero <i>Acanthamoeba</i>.....	02
2.2. Ceratite Amebiana.....	05
2.3. Encefalite Granulomatosa Amebiana.....	07
2.4. Epidemiologia das Infecções por <i>Acanthamoeba</i>.....	10
2.5. Proteases.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Local de Desenvolvimento do Trabalho.....	13
3.2. Cepas padrão (ATCC) e isolados ambientais.....	13
3.3. Cultivo dos organismos.....	14
3.4. Caracterização fenotípica dos isolados.....	14
3.4.1. <i>Termotolerância e Osmotolerância.....</i>	<i>14</i>
3.5. Caracterização da Atividade Proteolítica dos Isolados.....	15
3.5.1. <i>Produção de Meio Condicionado (MC).....</i>	<i>15</i>
3.5.2. <i>Determinação de Proteínas Totais.....</i>	<i>15</i>
3.5.3. <i>Determinação da Atividade Proteolítica.....</i>	<i>15</i>
3.5.4. <i>Caracterização da atividade proteolítica de acordo com a Temperatura e</i>	
<i>pH.....</i>	<i>16</i>
3.5.5. <i>Zimogramas.....</i>	<i>16</i>
3.5.6. <i>Caracterização das Proteases.....</i>	<i>17</i>
3.6. Teste <i>in vivo</i> para avaliação da patogenicidade dos isolados.....	17
3.6.1. <i>Modelo in vivo de Infecção Ocular por <i>Acanthamoeba</i> (Ceratite).....</i>	<i>17</i>
3.6.2. <i>Modelo in vivo de Infecção por Inoculação Intra-Nasal.....</i>	<i>18</i>
3.7. Cortes histológicos.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1. Avaliação do Modelo <i>in vivo</i> de Infecção Ocular por <i>Acanthamoeba</i>	
(Ceratite).....	20

4.2. Avaliação do Modelo <i>in vivo</i> de Infecção por <i>Acanthamoeba</i> através de Inoculação Intra-Nasal.....	26
4.3. Proteases secretadas por <i>Acanthamoeba</i>.....	33
4.3.1. <i>Perfil de Proteases em Gel de Zimograma dos isolados de Acanthamoeba utilizados no Modelo de Infecção Ocular.....</i>	34
4.3.2. <i>Perfil de Proteases em Gel de Zimograma dos isolados e reisolados de Acanthamoeba utilizados no Modelo de Infecção Intra-Nasal.....</i>	36
4.3.3. <i>Caracterização das proteases secretadas pelos isolados de Acanthamoeba estudados no Modelo de Infecção Ocular.....</i>	43
4.3.4. <i>Caracterização das proteases secretadas pelos isolados de Acanthamoeba estudados no Modelo de Infecção Intra-Nasal.....</i>	46
4.3.5. <i>Atividade proteolítica dos isolados de Acanthamoeba utilizados no Modelo de Infecção Ocular e influência da temperatura e pH na atividade.....</i>	51
4.3.6. <i>Atividade proteolítica dos isolados e reisolados de Acanthamoeba utilizados no Modelo de Infecção Intra-Nasal e influência da temperatura e pH na atividade.....</i>	53
4.4. Caracterização <i>in vivo</i> da patogenicidade de isolados de <i>Acanthamoeba</i>.....	57
4.4.1. <i>Caracterização fisiológica dos isolados de Acanthamoeba utilizados no Modelo de Infecção Ocular.....</i>	58
4.4.2. <i>Caracterização fisiológica dos isolados de Acanthamoeba utilizados no Modelo de Infecção Intra-Nasal.....</i>	60
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
6. BIBLIOGRAFIA.....	64
ANEXOS.....	77

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Genótipo de <i>Acanthamoeba</i> e associação com ocorrência de doenças em humanos.....	04
Tabela 2. Relação de isolados de <i>Acanthamoeba</i> estudados.....	14
Tabela 3. Avaliação do modelo <i>in vivo</i> de infecção por <i>Acanthamoeba</i> através de inoculação intra-nasal.....	28
Tabela 4. Proteases identificadas em isolados de <i>Acanthamoeba</i> e atividade relacionada.....	41
Tabela 5. Perfil das principais proteases secretadas pelos isolados de <i>Acanthamoeba</i> estudados no modelo <i>in vivo</i> de infecção ocular, conforme bandas (PM) presentes no gel de zimograma na ausência e na presença de inibidores de proteases específicos.....	45
Tabela 6. Perfil das principais proteases secretadas pelos isolados e reisolados de <i>Acanthamoeba</i> utilizados para infecção intra-nasal no modelo <i>in vivo</i> , conforme bandas presentes no gel de zimograma na ausência e na presença de inibidores de proteases específicos.....	48
Tabela 7. Influência da temperatura sobre a atividade proteolítica dos Isolados de <i>Acanthamoeba</i> estudados no modelo <i>in vivo</i> para infecção ocular.....	52
Tabela 8. Influência da temperatura na atividade proteolítica dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> utilizados para infecção intra-nasal no modelo <i>in vivo</i>	54
Tabela 9. Termotolerância e osmotolerância dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> estudados no modelo <i>in vivo</i> para infecção ocular.....	59

Tabela 10. Comparação entre termotolerância e osmotolerância de *Acanthamoeba* estudadas no modelo *in vivo* para infecção ocular, antes e depois do reisolamento..... 59

Tabela 11. Termotolerância e osmotolerância dos isolados de *Acanthamoeba* utilizados para infecção intranasal no modelo *in vivo*, antes e depois de reisolados..... 60

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i>	03
Figura 2. Cisto de <i>Acanthamoeba</i>	03
Figura 3. Ceratite Amebiana em humano. Infiltrado neutrofílico em formato de anel em caso avançado da doença (DART <i>et al.</i> , 2009).....	07
Figura 4. Modelo proposto para disseminação da <i>Acanthamoeba</i> na Encefalite Granulomatosa Amebiana (adaptado de Khan, 2006).....	08
Figura 5. Lesão de ceratite por <i>Acanthamoeba</i> em olho de rato no modelo <i>in vivo</i> de infecção ocular.....	21
Figura 6. Trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> reisolados das lesões oculares em ratos (Aumento: 100x).....	21
Figura 7. Evolução da infecção ocular pelo isolado PW-MH2. A: Primeiro dia após infecção; B: Terceiro dia após infecção; C: Sétimo dia após infecção; D: Décimo dia após infecção; E: Vigésimo dia após infecção, regressão total da lesão.....	23
Figura 8. Pulmões de ratos infectados via intranasal com <i>Acanthamoeba</i> . A: Pulmão de rato não infectado; B: Pulmão com infecção confirmada por <i>Acanthamoeba</i> ; C e D: Lesões no pulmão infectado. As setas indicam os diferentes tipos de lesões presentes no tecido.....	30
Figura 9. Fígados de ratos infectados via intranasal com <i>Acanthamoeba</i> . A: Fígado que não foi infectado pela <i>Acanthamoeba</i> . B: Fígado com infecção confirmada por <i>Acanthamoeba</i> . Setas indicam focos de lesões presentes no tecido.....	30

- Figura 10.** Cérebros dos ratos infectados via intranasal com *Acanthamoeba*. A: Cérebro com arquitetura tecidual normal e não infectado com *Acanthamoeba*; B: Cérebro com arquitetura tecidual alterada com infecção confirmada por *Acanthamoeba*..... 31
- Figura 11.** Corte histológico do tecido pulmonar infectado por *Acanthamoeba*. As flechas apontam dois trofozoítos. Corte histológico de 20 µm de espessura. Imagem em microscópio óptico, aumento de 400X, coloração hematoxilina-eosina..... 32
- Figura 12.** Corte histológico de fígado (A) e cérebro (B) infectado por *Acanthamoeba*. As setas apontam dois trofozoítos (T) e cistos (C) identificados. Corte histológico de 20 µm de espessura. Imagem em microscópio óptico, aumento de 400X, coloração hematoxilina-eosina..... 33
- Figura 13.** Perfil de atividade proteolítica em gel de zimograma contendo gelatina dos diferentes isolados de *Acanthamoeba* estudados no modelo *in vivo* de infecção ocular. Peso molecular estimado das bandas indicado à esquerda (kDa)..... 35
- Figura 14.** Perfil de atividade proteolítica em gel de zimograma contendo gelatina dos diferentes isolados de *Acanthamoeba* utilizados para infecção intra-nasal no modelo *in vivo*. Peso molecular estimado das bandas indicado à esquerda (kDa)..... 37
- Figura 15.** Perfil de atividade proteolítica em gel de zimograma contendo gelatina dos diferentes isolados de *Acanthamoeba* estudados no modelo *in vivo* de infecção ocular. A: sem incubação com EDTA e B: Pré-incubados com EDTA. Peso molecular estimado das bandas indicado à esquerda (kDa)..... 44
- Figura 16.** Perfil de atividade proteolítica em gel de zimograma contendo gelatina dos diferentes isolados de *Acanthamoeba* estudados no modelo *in vivo* de infecção ocular. A: sem incubação com PMSF e B: pré-incubados com PMSF. Peso molecular estimado das bandas indicado à esquerda (kDa)..... 45
- Figura 17.** Perfil de atividade proteolítica em gel de zimograma contendo gelatina dos diferentes isolados de *Acanthamoeba* utilizados para infecção intra-nasal no modelo *in vivo*. A: sem incubação com EDTA. B: pré-incubados com EDTA. Peso molecular estimado das bandas indicado à esquerda (kDa)..... 47

Figura 18. Perfil de atividade proteolítica em gel de zimograma contendo gelatina dos diferentes isolados de <i>Acanthamoeba</i> utilizados para infecção intra-nasal no modelo <i>in vivo</i> . A: sem incubação com PMSF e B: pré-incubados com PMSF. Peso molecular estimado das bandas indicado à esquerda (kDa).....	48
Figura 19. Comparação da atividade proteolítica dos meios condicionados dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> estudados no modelo <i>in vivo</i> para infecção ocular em diferentes temperaturas. T 100%: temperatura ótima de atividade das proteases do MC; 37°C: Temperatura padrão de incubação do ensaio de azocaseína.....	52
Figura 20. Influência do pH sobre a atividade proteolítica dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> estudados no modelo <i>in vivo</i> para infecção ocular.....	53
Figura 21. Atividade proteolítica dos isolados utilizados para infecção intra-nasal no modelo <i>in vivo</i> , antes e depois do reisolamento na temperatura ótima para atividade.....	54
Figura 22. Influência do pH na atividade proteolítica dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> utilizados para infecção intra-nasal no modelo <i>in vivo</i>	55

RELAÇÃO DE ABREVEATURAS

- AP2 – *Acanthamoeba polyphaga* 2
AP4 – *Acanthamoeba polyphaga* 4
ATCC – American Type Culture Collection
AVL – Amebas de Vida Livre
CDC – Center for Disease Control and Prevention (Centro para Controle e Prevenção de Doenças)
Ig – Imunoglobulina
CM – Meio Condicionado
mg – Miligrama
mL – Mililitro
mm – Milímetro
NEFF – *Acanthamoeba castellanii* NEFF
°C – Graus Celsius
PBS – Phosphate buffered saline (Tampão Fosfato Salino)
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PHMB – Biguanida Poliexametileno
PYG – Meio Protease, peptona e extrato de levedura
rpm – Rotações Por Minuto
rRNA – Ácido Ribonucléico Ribossomal
T4 – *Acanthamoeba castellanii* T4
µL – Micrograma
µm – Micrômetro
w/v – Peso/Volume

1. INTRODUÇÃO

Protozoários do gênero *Acanthamoeba* constituem um grupo amplamente distribuído no meio ambiente, sendo encontradas no solo, na água e no ar. Algumas espécies podem comportar-se como parasitos facultativos de seres humanos e de animais domésticos, causando infecções consideradas acidentais e/ou oportunistas, como a Encefalite Granulomatosa Amebiana (EGA) e a Ceratite Amebiana.

Proteases são fatores de virulência bastante conhecidos na maioria dos patógenos virais, bacterianos, protozoários e helmintos. Essas enzimas hidrolisam ligações peptídicas e, portanto, apresentam a capacidade de degradar vários substratos. Diversos estudos têm associado a patogenia causada por *Acanthamoeba* à produção e secreção de proteases. Foi verificado que esses protozoários podem apresentar alterações na virulência de acordo com as proteases extracelulares que são capazes de expressar. Portanto, as proteases produzidas por *Acanthamoeba* não apenas podem estar atuando na patogenia, mas podem servir de marcadores para diferenciar amebas patogênicas e não-patogênicas.

Neste sentido, o envolvimento de proteases secretadas na patogenicidade de *Acanthamoeba* tem sido bastante estudado e se observa grande variedade de moléculas caracterizadas, tanto intra quanto inter-espécie, de maneira que se especula sua aplicação no desenvolvimento de tratamentos, métodos diagnósticos e de diferenciação de isolados. Além disso, embora muitos trabalhos relacionem proteases com patogenicidade, raramente estudos *in vivo* são aplicados para comprovar o papel das proteases na patogênese da Ceratite amebiana e EGA, e quando aplicados se restringem a utilização de isolados clínicos de *Acanthamoeba*. Neste estudo objetivou-se, através de testes *in vivo* e *in vitro*, avaliar diferentes isolados de *Acanthamoeba* em relação à produção de proteases e relacioná-la à patogênese dos mesmos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Gênero *Acanthamoeba*

As amebas constituem o maior e mais diversificado grupo de organismos dentre os protistas, e vêm sendo estudadas desde a invenção do microscópio primitivo (Khan, 2006). Amebas de vida livre (AVL) dos gêneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia* e *Naegleria* são as mais estudadas, pois são sabidamente capazes de causar uma infecção fatal do sistema nervoso central (SNC) em humanos e outros animais. (Visvesvara & Schuster, 2008).

Protozoários do gênero *Acanthamoeba* pertencem ao filo Sarcomastigophora e sub-filo Sarcodina e estão entre os mais isolados na natureza. Esse organismo possui microprojeções formadas por citoplasma hialino, denominadas acantopódios, os quais permitem seu deslocamento e são responsáveis pela adesão a superfícies (biológicas ou inertes) (Bowers & Korn, 1968; Khan, 2006). 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 (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Caumo *et al.*, 2009; Magliano *et al.*, 2009; Carlesso *et al.*, 2010).

Seu ciclo de vida apresenta dois estágios: trofozoítos (Figura 1) e cistos (Figura 2). Os trofozoítos representam a forma metabolicamente ativa, possuem normalmente um tamanho aproximado de 12 - 35 μm de diâmetro, podendo variar entre isolados pertencentes a diferentes espécies/genótipos e dividem-se assexuadamente, por fissão binária (Khan, 2006). Durante este estágio *Acanthamoeba* se alimenta de bactérias, algas, fungos ou pequenas partículas orgânicas e muitos dos vacúolos de alimentação podem ser vistos no citoplasma das células (Khan, 2006). O segundo estágio é representado pelo cisto, uma estrutura de

dormência formada quando o trofozoíto se encontra em situações de adversidade, como deficiência nutricional do meio, dessecação, alterações no pH, temperatura, entre outras (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Cistos possuem poros conhecidos como ostíolos, que são usados para monitorar mudanças ambientais. Essa forma pode permanecer viável por muitos anos e, em condições favoráveis, os trofozoítos emergem dos cistos através dos poros (Visvesvara & Schuster, 2008).

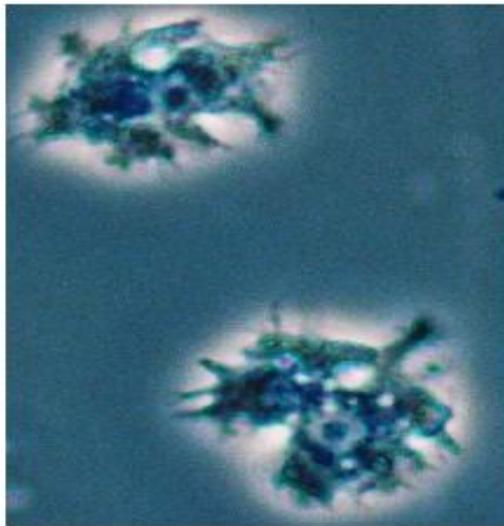


Figura 1. Trofozoíto de *Acanthamoeba*
Fonte: Karin Caumo- Lab. de Parasitologia/UFRGS

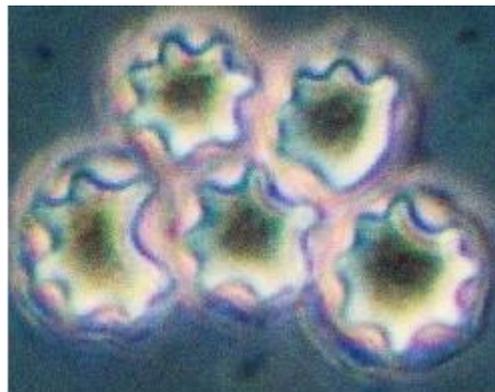


Figura 2. Cisto de *Acanthamoeba*
Fonte: Karin Caumo - Lab. de Parasitologia/UFRGS

Estes protozoários não necessitam de um hospedeiro para completar o seu ciclo de vida, sendo conhecidos como anfizóicos, devido à sua capacidade de existir normalmente como organismos de vida livre e também serem capazes de sobreviver em tecidos de seres humanos e outros animais, tornando-se agentes causadores de

graves doenças, como a Ceratite e Encefalite Granulomatosa (Jones, 1975; Visvesvara & Schuster, 2008). Dessa forma, as infecções causadas por eles são consideradas acidentais ou oportunistas (Alvarenga *et al.*, 2001; Booton *et al.*, 2005).

Atualmente a taxonomia molecular descreve 18 genótipos diferentes dentro do gênero *Acanthamoeba*, sendo eles nomeados T1, T2a, T2b até T17, baseados no sequenciamento do gene que codifica a subunidade pequena (SSU) do rRNA (Stothard *et al.*, 1998; Maghsood *et al.*, 2005; Corsaro & Venditti, 2010; Nuprasert *et al.*, 2010). Os genótipos T2, T3, T4, T6 e T11 têm sido isolados clinicamente (Tabela 1) como agentes causadores da ceratite amebiana, sendo o genótipo T4 o principal causador desta patologia, mesmo quando não se trata do genótipo de maior ocorrência em determinado ambiente (Maghsood *et al.*, 2005; Booton *et al.*, 2005). Os genótipos T16 e T17 foram recentemente descritos, ambos isolados de água natural de lagoa doce (Corsaro & Venditti, 2010; Nuprasert *et al.*, 2010).

Tabela 1. Genótipo de *Acanthamoeba* e associação com ocorrência de doenças em humanos

Genótipo	Doença
T1	Encefalite
T2a	Ceratite
T2b	NA
T3	Ceratite
T4	Ceratites e Encefalites
T5	NA
T6	Ceratites
T7	NA
T8	NA
T9	NA
T10	Encefalite
T11	Ceratite
T12	Encefalite
T13	NA
T14	NA
T15	NA
T16	NA
T17	NA

NA: não associada a nenhuma doença.

Tabela adaptada de KHAN, 2006.

2.2. Ceratite Amebiana

Em 1974, Nagington *et al.* relataram o primeiro caso de ceratite por *Acanthamoeba* e, a partir de então passou-se a dar importância a este protozoário como agente de infecções oculares e cegueira (Nagington *et al.*, 1974; Sotelo-Avila *et al.*, 1974; Radford *et al.*, 1995). Diversas espécies do gênero *Acanthamoeba*, entre elas *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhysodes*, *A. griffini*, *A. quina* e *A. lugdunensis*, podem causar a infecção, porém aquelas que pertencem ao genótipo T4 são mais frequentemente responsáveis pelas lesões oculares (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Maghsood *et al.*, 2005).

Acanthamoeba agride a córnea causando uma doença progressiva, podendo ocorrer em indivíduos imunocomprometidos ou saudáveis, sendo particularmente prevalente entre usuários de lentes de contato. Em geral, uma lesão prévia na córnea e a virulência do isolado presente no olho são os fatores que mais influenciam no desenvolvimento da ceratite (Sharma *et al.*, 1990).

Ceratite (Figura 3) é uma doença progressiva e dolorosa que ameaça a visão. Seus principais sintomas são vermelhidão, lacrimejamento, fotofobia, opacidade e edema nas pálpebras. Inicialmente, as amebas são restritas ao epitélio da córnea e tardiamente invadem o estroma, provocando um processo inflamatório com infiltração de neutrófilos, caracterizando o anel neutrofílico e em raros casos, podem atingir a retina (Jonhs *et al.*, 1988). O risco de perda de visão é elevado e eventualmente, em casos não tratados, pode evoluir para cegueira e até enucleação (Nieder Korn *et al.*, 1999).

Essa infecção está associada, na maioria dos casos, ao uso de lentes de contato (Awwad *et al.*, 2007). Entre os fatores que promovem a doença pode-se citar o uso de soluções salinas caseiras, a precariedade da higienização das lentes e estojos, que favorece a proliferação microbiana e a abrasão da córnea, o uso por tempo prolongado da lente de contato e a formação de biofilmes na superfície das lentes (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Booton *et al.*, 2005).

Em relação ao uso prolongado de lentes de contato, BEATTIE *et al.* (2003) demonstraram sua relação com a ceratite em um estudo onde compararam a capacidade de *Acanthamoeba* em se ligar à lentes de contato usadas e novas, comprovando que o protozoário liga-se com mais facilidade às lentes de contato usadas, possivelmente devido a presença de açúcares, como glicose, frutose, galactose, proteínas, glicoproteínas, lipídeos ou biofilmes na superfície destas lentes

de contato. A presença de açúcares pode favorecer a ligação de uma Proteína Ligante à Manose (MBP) presente em *Acanthamoeba*, enquanto a formação de biofilmes em lentes de contato está relacionada ao aumento da dificuldade de eliminar patógenos, uma vez que se aderem melhor aos biofilmes (Tomlinson *et al.*, 2000; Beattie *et al.*, 2003).

Uma vez ferida, a córnea promove a superexpressão de proteínas glicosiladas com manose. Essas são reconhecidas pela MBP presente na ameba, promovendo a adesão do parasito ao epitélio e liberação de proteases (Khan, 2003; Clark & Niederkorn, 2006). Estudos recentes sugerem que substâncias como Imunoglobulina A e proteases, presentes no fluido lacrimal, garantem a proteção a indivíduos saudáveis, uma vez que impedem a aderência de *Acanthamoeba*, processo chave na patogenicidade da ceratite (Saravanan *et al.*, 2008).

O diagnóstico rápido do tipo de microrganismo que causa a ceratite é crítico para que não haja danos permanentes à visão. Este se dá, no caso de *Acanthamoeba*, pela associação dos sintomas clínicos do paciente com o isolamento do organismo, através de biópsia da córnea ou mesmo, em casos de usuários de lentes de contato, direto do estojo de lentes de contato. Diversos métodos podem ser utilizados para o isolamento e confirmação da infecção, incluindo microscopia confocal, cultivo em meios específicos, exames histopatológicos e análise do gene 18S rDNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sendo este último o mais sensível entre os métodos (Schroeder *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2001).

Com relação ao tratamento, a ceratite por *Acanthamoeba* caracteriza-se por ser uma doença de tratamento difícil e demorado, cujo sucesso depende da associação de diversos medicamentos, que visa combater a resistência dos cistos que se formam no local. O tratamento indicado inclui o uso de biguanida juntamente com diamidina, também conhecido como Brolene®, ou Desomedine. Ainda podem ser utilizados antifúngicos como miconazol, fluconazol e cetoconazol e em casos de infecção bacteriana associada, pode-se ainda associar neomicina ou cloranfenicol. Trata-se de um tratamento longo e o sucesso depende inicialmente da aplicação tópica das drogas por dois ou três dias, a cada hora. Posteriormente, o número de aplicações por dia é reduzido, porém o tratamento pode durar vários meses, chegando a um ano (Auran *et al.*, 1987; Chomicz *et al.*, 2005; Khan, 2006).

O adiamento do tratamento pode levar à ulceração da córnea, com presença de infiltrado no estroma, perfuração e finalmente, perda de visão (Saeed *et al.*, 2009). Ocasionalmente, o tratamento também pode não ter o efeito esperado fazendo-se necessárias intervenções cirúrgicas como ceratoplastia, debridamento e transplante de córnea (Ficker *et al.*, 1993).



Figura 3. Ceratite Amebiana em humano. Infiltrado neutrofílico em formato de anel em caso avançado da doença (Dart *et al.*, 2009).

2.3. Encefalite Granulomatosa Amebiana

A Encefalite Granulomatosa Amebiana (EGA) caracteriza-se como uma infecção progressiva do Sistema Nervoso Central (SNC), que acomete preferencialmente indivíduos imunocomprometidos. Pode-se observar uma grande resposta pró-inflamatória, invasão da barreira hemato-encefálica, tecido conectivo e danos neurológicos que levam à disfunção cerebral, onde o paciente evolui para morte em poucos dias ou semanas (Martinez & Visvesvara, 1997). Assim como no caso da ceratite, várias espécies de *Acanthamoeba* podem ser agente causador de EGA (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Os principais fatores que predis põem à infecção são HIV, diabetes, utilização de imunossupressores, câncer, desnutrição e alcoolismo.

Diversas fontes sugerem que a rota de disseminação de *Acanthamoeba* se dá pela via hematogênica, sendo este processo pré-requisito para ocorrência da encefalite. Sugere-se que *Acanthamoeba* possa atingir a circulação sanguínea via inalação pelo epitélio olfatório ou lesão cutânea (Martinez & Visvesvara, 1997). Deste ponto, *Acanthamoeba* atinge os pulmões, invade o espaço intravascular e em

seguida é disseminada pela via hematogênica, podendo atingir o SNC (Figura 4). Como agentes oportunistas, podem invadir e colonizar outros tecidos levando a infecções disseminadas que atingem pulmões, fígado, rins, pele, pâncreas e próstata (Khan, 2006; Khan & Siddiqui, 2009; Mortazavi *et al.*, 2010). Alguns estudos têm demonstrado que transplantes são também fatores de risco para o acometimento sistêmico deste protozoário (Young *et al.*, 2010).

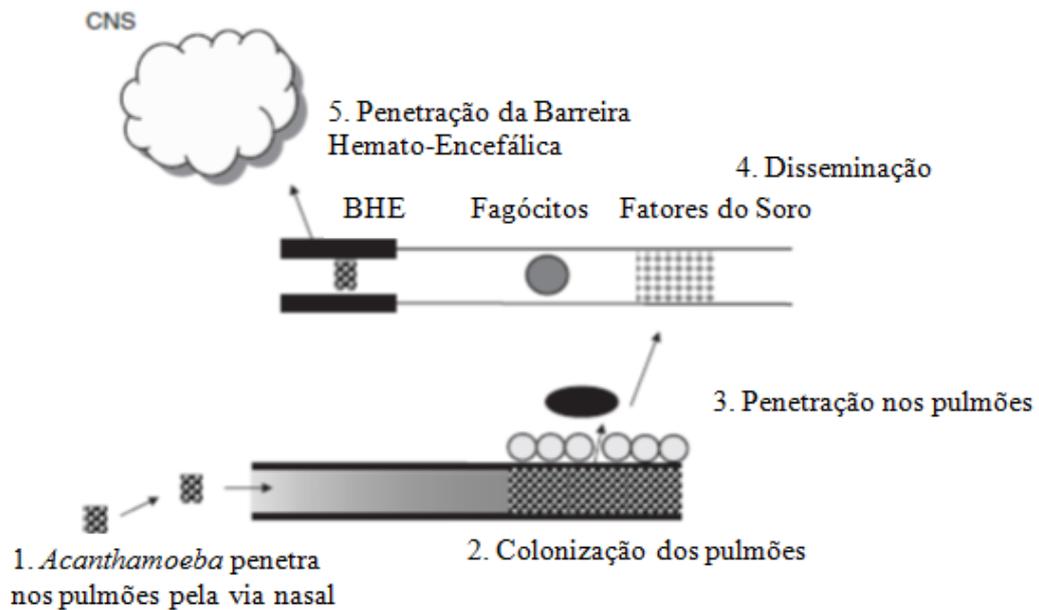


Figura 4. Modelo proposto para disseminação da *Acanthamoeba* na Encefalite Granulomatosa Amebiana (adaptado de Khan, 2006).

Ainda que muitos aspectos da EGA já estejam esclarecidos, até o momento não está definido o mecanismo de invasão da barreira hemato-encefálica (Martinez, 1985, 1991; Martinez & Visvesvara, 1997. Siddiqui *et al.*, 2011). Estudos sugerem que participação de enzimas com atividade proteolítica e receptores para glicoproteínas e açúcares presentes em *Acanthamoeba* têm um papel fundamental neste processo.

Após infecção, os sintomas clínicos podem ser confundidos facilmente com os de meningite viral, bacteriana ou tuberculosa. Incluem febre, cefaléia, mudanças comportamentais, hemiparesia, letargia, rigidez da nuca, afasia, ataxia, náuseas, vômitos, paralisia de nervos cranianos, aumento da pressão intracraniana convulsões e morte. Estes se devem a lesões hemorrágicas necrosantes e grave encefalite (Martinez, 1991). Deve-se suspeitar ainda mais do diagnóstico de EGA

quando os pacientes apresentam sintomas associados, como infecções respiratórias, úlceras de pele ou abscessos cerebrais.

Exames *post mortem*, revelam edemas graves e necrose hemorrágica, a qual não se sabe se resulta da presença de trofozoítos no local ou do processo inflamatório. A maioria das lesões ficam restritas ao lobo parietal e temporal, porém em indivíduos muito imunocomprometidos as lesões são disseminadas e atingem o gânglio basal, mesencéfalo e tronco cerebral (Siddiqui *et al.*, 2011).

As lesões da EGA são caracterizadas pela formação de necrose e granulomas no tecido cerebral (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Um exsudato inflamatório crônico é observado no córtex, composto principalmente por leucócitos, além disso, vários trofozoítos podem ser observados nesse tecido (Martinez, 1985). Em casos que ocorrem em pacientes com imunodeficiência grave a lesão granulomatosa característica pode estar ausente ou ser mínima (Martinez & Visvesvara, 1997).

O diagnóstico da EGA é bastante problemático e requer que o médico suspeite da causa. Atualmente, a grande maioria dos casos só é diagnosticado *post morte*. Entretanto, em casos de suspeita, alguns métodos são bastante úteis em fornecer evidências mais específicas da infecção, tais como tomografia computadorizada, ressonância magnética, análise do líquido cefalo-raquidiano (LCR) e imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). A confirmação do diagnóstico, entretanto, se dá pela observação microscópica do protozoário no LCR ou através de biópsia do cérebro, sendo que ambos exigem profissional familiarizado com a morfologia do organismo em questão.

Até o momento não há um tratamento definido para os casos de EGA. As maiores complicações enfrentadas neste aspecto incluem a grande resistência de *Acanthamoeba* à maioria dos antibióticos e a dificuldade destes em ultrapassar a barreira hemato-encefálica e agir no SNC. Por hora, o tratamento se dá por uma combinação de antibióticos e antifúngicos que atuam no SNC e são sabidamente eficazes contra amebas de vida livre. Pode ser utilizado cetoconazol, fluconazol, sulfadiazina, pentamidina, anfotericina B, azitromicina, itraconazol e rifampicina. Além destes antibióticos apresentarem sérios efeitos colaterais, mesmo com o tratamento, os sobreviventes podem desenvolver deficiências como perda de audição e visão (Kotting *et al.*, 1992).

2.4. Epidemiologia das infecções por *Acanthamoeba*

O número de casos de ceratite por *Acanthamoeba* tem crescido substancialmente nos últimos anos, principalmente a partir da década de 90, tendo-se confirmado mais de 30 casos até 2006 (Awwad *et al.*, 2007; Patel & McGhee, 2009). Diversos estudos relatam maior incidência desta infecção em usuários de lentes de contato, uma vez que esses indivíduos possuem até 80 vezes mais probabilidade de contrair ceratite (Dart *et al.*, 1991; Alvord *et al.*, 1998). Em países desenvolvidos cerca de 83% dos casos são diagnosticados em usuários de lente de contato (Carvalho *et al.*, 2009). Os dados ainda apontam que a taxa de incidência de ceratite por *Acanthamoeba* varia bastante no mundo todo, apresentando uma média de 0,40 casos de ceratite por 10 000 usuários de lentes de contato, variando conforme a região geográfica (Stehr-Green *et al.*, 1989; Radford *et al.*, 2002; Lam *et al.*, 2002). SCHUSTER & VISVESVARA (2004), estimaram a ocorrência de mais de 3.000 casos de ceratite por *Acanthamoeba* entre 1960 e 2000. Entretanto, somente nos Estados Unidos, mais de 3.000 casos foram estimados por outros pesquisadores (Qvarnstrom *et al.*, 2006). Neste mesmo país, em 2007, uma investigação de 22 centros de oftalmologia conduzida pelo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) revelou um aumento nacional do número de casos de ceratite por *Acanthamoeba* entre 2004 e 2006. Este aumento foi relacionado ao uso da solução para lentes de contato “*Advanced Medical Optics Complete Moisture Plus*” contaminada (Visvesvara & Shuster, 2008).

Até o ano de 2009, somente dois casos de EGA foram reportados (Ringsted *et al.*, 1976; Im & Kim, 1998), sendo que ambos evoluíram para óbito e envolviam indivíduos imunossuprimidos. Contudo, certamente estes números são subestimados, visto que dados epidemiológicos referentes à EGA são raros, em parte porque trata-se geralmente de uma doença secundária, mas também pela falta de conhecimento acerca da EGA, que muitas vezes não chega a ser diagnosticada (Khan, 2006). Em 2004 um trabalho estimou que entre 1960 e 2000 ocorreram aproximadamente 200 casos de EGA (Schuster *et al.*, 2004). Entretanto, os dados disponíveis em relação à epidemiologia da EGA são hipotéticos, relacionados a pacientes com HIV/AIDS, que sabe-se ser o grupo de maior risco para a doença. Considerando-se estes dados, calcula-se 1,57 casos de EGA para cada 10.000

casos de morte por HIV/AIDS nos Estados Unidos, sendo que este número pode ser muito maior em países menos desenvolvidos (Khan, 2006).

2.5. Proteases

Proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas e, portanto, apresentam a capacidade de degradar vários substratos. São fatores de virulência bastante conhecidos na maioria dos patógenos virais, bacterianos, protozoários e helmintos (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Khan, 2006).

Para que uma infecção por *Acanthamoeba* se estabeleça, a adesão a células do hospedeiro e sua degradação, além da capacidade de invasão dos tecidos são eventos fundamentais (Khan, 2003; Rocha-Azevedo *et al.*, 2009b). Durante os eventos de invasão da córnea ou do cérebro, trofozoítos de *Acanthamoeba* causam danos aos tecidos, provavelmente como resultado de vários mecanismos patogênicos diferentes, incluindo a fagocitose de células do hospedeiro, a produção de enzimas, como diversas proteases capazes de degradar componentes da matriz extracelular (MEC) e a presença de proteína de ligação à manose (Kim *et al.*, 2003; ; Sissons *et al.*, 2006; Visvesvara & Schuster, 2008).

Um grande número de estudos têm associado a patogenia causada por *Acanthamoeba* à produção e secreção de proteases (He *et al.*, 1990; Cho *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2006; Rocha-Azevedo *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009). ROCHA-AZEVEDO *et al.* (2009a), observaram que uma espécie patogênica de *Acanthamoeba* reconhece proteínas da MEC, como colágeno I e laminina, de maneira mais eficiente, quando comparada à espécie não-patogênica, o que pode representar um fator que restringe o potencial patogênico de alguns isolados, pois esta pode ser uma etapa crítica para ativar a secreção de diferentes proteases. Outros trabalhos também verificaram que estas enzimas se mostram superexpressas apenas em isolados patogênicos, o que indica envolvimento destas proteases na patogenicidade (Khan *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2006; Rocha-Azevedo *et al.*, 2009a).

Em um estudo com *Acanthamoeba castellanii*, foi isolada e caracterizada uma serino protease de 12 kDa capaz de degradar proteínas da MEC e também Imunoglobulina A, Imunoglobulina G, plasminogênio, fibrinogênio, hemoglobina e

proteínas da córnea de coelho, além de demonstrar forte efeito citopático frente a outras células cultivadas (Na *et al.*, 2001). Segundo os autores, a capacidade de degradação desta enzima indica sua estreita relação com a destruição corneana observada na ceratite por *Acanthamoeba*. HURT *et al.* (2003) em seu trabalho, sugerem que a interação dos trofozoítos com proteínas da superfície corneana induz *A. castellanii* a secretar uma serino protease de 133 kDa, capaz de lisar células do epitélio corneano humano e de roedores. ALSAM *et al.* (2005), também estudaram uma protease de *Acanthamoeba* de 133 kDa, retirada de um paciente com EGA. Esta enzima em contato com células que formavam um modelo *in vitro* da barreira hemato-encefálica levou a um aumento de 80% da permeabilidade desta barreira, revelando seu forte efeito citopático e associando-a fortemente à virulência de *Acanthamoeba*. Em outro trabalho, uma serino protease purificada de um isolado de *A. castellanii* apresentou forte efeito citopático e atividade colagenolítica, efeitos que foram inibidos na presença de fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) (Cho *et al.*, 2000).

Pesquisas com inibidores de proteases têm demonstrado o potencial de algumas substâncias em inibir a atividade das proteases secretadas, entre elas PMSF, EDTA e 1,10-fenantrolina, inibidores de serino e metalo proteases, respectivamente, como também aprotinina, outro inibidor de serino proteases (Khan *et al.*, 2000; Rocha-Azevedo *et al.*, 2009b; Leitsch *et al.*, 2010).

Aliado a isto, foi evidenciado que fatores presentes em tecidos animais, como tensão de 5% de CO₂ (Khan *et al.*, 2000) e a manose (Alizadeh *et al.*, 2007) podem induzir a expressão de proteases extracelulares relacionadas à invasão dos trofozoítos na córnea e nas células do estroma. Neste sentido, alguns autores sugerem que a produção de proteases poderia ser usada como um marcador para a diferenciação de isolados patogênicos e não patogênicos de *Acanthamoeba* (Khan *et al.*, 2000).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local de Desenvolvimento do Trabalho

O trabalho foi realizado no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, e no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.2. Cepas padrão (ATCC) e Isolados ambientais

Foram utilizadas cepas ATCC de origem clínica, *A. castellanii* (ATCC 50492) e *A. polyphaga* (ATCC 30461) e de origem ambiental, *A. castellanii* (ATCC 30010) e *A. polyphaga* (ATCC 30872)

Cinco isolados ambientais provenientes de água de piscina, ar condicionado, estojo de lentes de contato e água de torneira, também foram estudados.

Na tabela 2 estão discriminados os isolados de *Acanthamoeba* previamente caracterizados utilizados neste trabalho, o local de isolamento, os respectivos genótipos e as referências dos trabalhos onde estes isolados foram primeiramente descritos. Todos os isolados ambientais foram isolados pelo grupo de pesquisa em Parasitologia da UFRGS, onde são mantidos para outros estudos.

Tabela 2. Relação de isolados de *Acanthamoeba* estudados

Isolado	Origem	Genótipo	Referencia
T4	ATCC 50492 - Ceratite	T4	ATCC
AP2	ATCC 30461 - Ceratite	T4	ATCC
AP4	ATCC 30872 - Água	T4	ATCC
NEFF	ATCC 30010 - Solo	T4	ATCC
ACM	Ar condicionado	T11	Dados do grupo de pesquisa em parasitologia - UFRGS
ACP1	Ar condicionado	Sequência com similaridade insuficiente para determinar genótipo	Dados do grupo de pesquisa em parasitologia - UFRGS
TW79	Água de torneira	T2	Winck, M.A.T., 2011
PW-MH2	Água de piscina	T5	Caumo <i>et al</i> , 2009
LC30	Estojos de lentes de contato	T5	Pens, C.J., 2008

3.3. Cultivo dos organismos

Os organismos foram cultivados em meio PYG (2% de proteose peptona, 0,2% de extrato de levedo e 1,8% de glicose) contendo antibiótico penicilina-estreptomicina na concentração de 40 µL/mL e mantidos em estufa à temperatura de 30 °C.

3.4. Caracterização fenotípica dos isolados

3.4.1. Termotolerância e Osmotolerância

Uma suspensão de 1×10^3 trofozoítos/mL foi preparada e 5 µL inoculado no centro de uma placa de ágar Page recoberta com *Escherichia col.* (ATCC 25922). Inativadas pelo calor. As placas foram incubadas a 30, 37 e 42°C por sete dias e posteriormente o crescimento nas diferentes temperaturas foi observado em microscópio óptico (aumento de 100x), contando-se cistos e trofozoítos presentes em cinco campos em um raio de 20 milímetros do local da inoculação. Para avaliação da osmotolerância, foi utilizado ágar Page preparado com 0,5 e 1,0 Molar de manitol. As placas foram incubadas a 30°C por sete dias (Khan *et al.*, 2001) e

avaliadas em relação ao número de cistos e trofozoítos da mesma maneira que para o teste de termotolerância. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5. Caracterização da Atividade Proteolítica dos Isolados

3.5.1. Produção de Meio Condicionado (MC)

O MC foi preparado segundo protocolo adaptado de ALFIERI *et al.* (2000). Para produção de MC de cada isolado, 1×10^6 trofozoítos/mL foram cultivados em meio PYG a 30°C por 72 horas. Após este período, o MC foi centrifugado a 250 x g por 10 minutos, o sobrenadante filtrado através de uma membrana de 0,22 μm e posteriormente liofilizado.

3.5.2. Determinação de Proteínas Totais

Os MC liofilizados foram ressuspendidos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 e tiveram a concentração de proteínas totais determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Todos os MC tiveram a concentração ajustada para 0,5 mg/mL de proteína para realização dos experimentos.

3.5.3. Determinação da Atividade Proteolítica

Para determinar a atividade proteolítica presente em cada um dos MC avaliados, foi utilizado Ensaio da Azocaseína. Resumidamente, 100 μL de proteínas (MC ressuspendidos na concentração de 0,5 mg/mL) foram adicionados a 100 μL de uma solução de azocaseína 1% e a mistura incubada a 37°C por uma hora. Em seguida, 500 μL de TCA 10% (Ácido Tricloroacético) foram adicionados a cada tubo para parar a reação e as amostras foram centrifugadas a 250 x g por 5 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 1000 μL de NaOH 1,8N (Hidróxido de Sódio) e após 10 minutos as absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm (Lorenzo-Morales *et al.*, 2005). Para o controle negativo o TCA 10% foi adicionado antes da incubação e a absorbância obtida foi descontada do valor obtido para amostra. As absorbâncias são diretamente proporcionais à

atividade proteolítica das amostras. Os experimentos foram realizados em duplicata e a média das absorbâncias foi multiplicada por 10, de maneira que os resultados estão expressos em Unidade de Atividade Proteolítica em 1000 μ L (U/mL).

3.5.4. Caracterização da atividade proteolítica de acordo com a Temperatura e pH

O experimento acima descrito foi realizado incubando-se as amostras em diferentes temperaturas por uma hora (25, 30, 35, 37, 40, 42, 50, 60, 70 e 80 °C) (Alfieri *et al.*, 2000).

A atividade enzimática também foi testada em diferentes pHs (5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0) (Alfieri *et al.*, 2000). Para tanto a solução de azocaseína 1% foi preparada com diferentes tampões:

- Tampão Citrato (pH 5.0 – 5.5);
- Tampão Fostato (pH 6.0 – 7.5);
- Tampão Tris-HCl (pH 8.0 – 10.0).

Para ambos os experimentos, as absorbâncias são diretamente proporcionais à atividade proteolítica das amostras. Os experimentos foram realizados em duplicata e a média das absorbâncias foi multiplicada por 10, de maneira que os resultados estão expressos em Unidade de Atividade Proteolítica em 1000 μ L (U/mL).

3.5.5. Zimogramas

Os MC de diferentes isolados, ressuspendidos na concentração de 0,5 mg/mL de proteína, foram misturados no tampão de amostra (1:1) (sem SDS ou β -mercaptoetanol) e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), 12%, contendo gelatina na concentração de 2 mg/mL. Após a migração, o gel foi incubado em uma solução de Triton X-100 2,5% (w/v) por 60 minutos, sendo em seguida transferido para o tampão de desenvolvimento (50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, contendo 10 mM de CaCl_2) na temperatura de 37°C por 18 horas. Após esse período, o gel foi incubado em *Coomassie Brilliant Blue* para coloração. As áreas de digestão foram visualizadas como regiões não coradas (Alsam *et al.*, 2005).

3.5.6. Caracterização das Proteases

Para definir as diferentes classes de proteases produzidas e secretadas pelos isolados estudados, inibidores de proteases para classes específicas foram utilizados.

- Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) - inibidor de serino-protease na concentração final de 1mM;
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) - inibidor de metaloprotease na concentração final de 10 mM;

Os inibidores foram adicionados ao MC contendo as enzimas 30 minutos antes da aplicação da amostra no gel. Posteriormente o zimograma das amostras foi realizado conforme descrito no item anterior (Alfieri *et al.*, 2000). O EDTA, por se tratar de um inibidor reversível também foi adicionado ao tampão de desenvolvimento do gel de zimograma, na mesma concentração.

As áreas de digestão foram visualizadas como regiões não coradas e a avaliação da inibição provocada pelo composto foi realizada comparando-se o gel de zimograma com e sem inibidores.

3.6. Teste in vivo para avaliação da patogenicidade dos isolados

3.6.1. Modelo in vivo de Infecção Ocular por *Acanthamoeba* (Ceratite)

Este experimento foi baseado no trabalho de REN & WU (2010). Isolados ambientais (ACP1, ACM, TW79, PW-MH2 e LC30) e ATCC (T4, AP2, AP4, NEFF) foram utilizados para infecção. Preparou-se a solução estimulante (SE) a partir de cultivos axênicos dos isolados em meio PYG, contendo 1×10^6 trofozoítos/mL. O meio foi centrifugado ($250 \times g$ por 10 minutos), as amebas foram lavadas três vezes com PBS e o *pellet* foi ressuscitado em 300 μ L de PBS.

Como modelo animal foram utilizados ratos *Wistar* adultos, machos com aproximadamente três meses de vida e média de peso de 375 g. Todos os animais

tiveram os olhos previamente examinados e tratados com colírio cloranfenicol antes do início dos experimentos. Para infecção foi dada anestesia geral (cloridrato de ketamina 60 mg/kg e cloridrato de xilasina 8 mg/kg) e aplicou-se 5 µL de colírio anestésico em cada olho. Em seguida a córnea de ambos os olhos foi riscada três vezes na horizontal e na vertical com uma agulha estéril. Aplicou-se a SE no olho direito e PBS estéril no olho esquerdo (controle) e os olhos foram mantidos fechados por quatro horas. Posteriormente, as córneas foram monitoradas nos dias 01, 03, 07, 13 e 21, por visualização em lupa buscando-se lesões, exame microscópico direto e cultura do raspado da córnea, buscando cistos e trofozoítos. Foram considerados positivos para infecção os casos em que *Acanthamoeba* estava presente no cultivo. Os experimentos foram realizados em duplicata e tiveram aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Anexo A).

3.6.2. Modelo *in vivo* de Infecção por *Acanthamoeba* por inoculação Intra-Nasal

Foram utilizadas cepas de *Acanthamoeba* ATCC 50492 (T4); 30010 (NEFF); 30461 (AP2) e 30872 (AP4), mantidas axênicas em meio PYG. Sempre que a infecção com esses isolados tiveram sucesso, o protozoário reisolado dos animais foi novamente axenizado e alguns desses reisolados utilizados para uma nova infecção. A solução estimulante (SE) para infecção foi preparada a partir dos cultivos dos diferentes isolados, onde 1×10^6 trofozoítos/mL foi centrifugado a $250 \times g$ por 10 minutos, as amebas foram lavadas três vezes com PBS e o *pellet* foi ressuspendido em 200 µL de PBS.

Ratos *Wistar* adultos machos, com média de idade de três meses e peso médio de 375 g foram utilizados. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e dois animais foram utilizados como controle, tendo sido submetidos às mesmas condições do grupo teste. Os experimentos tiveram prévia aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Anexo A).

Para este modelo de infecção os animais foram imunossuprimidos com dexametasona (5 mg/Kg) (Cappila *et al.*, 2006), aplicada por via intraperitoneal durante três dias consecutivos antes da infecção. Posteriormente, os ratos foram

mantidos imunossuprimidos com dexametasona na mesma dose em intervalos de quatro dias. No terceiro dia de aplicação de dexametasona os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (60 mg/kg) e cloridrato de xilasina (8 mg/kg) e em seguida 200 µL da SE foi inoculada via intra-nasal. Após infecção, os animais foram acompanhados por 30 dias. Passado esse período, os ratos foram eutanasiados por depressão de oxigênio e os órgãos foram retirados e avaliados sob uma lupa para observação das lesões.

Pequenas porções destes órgãos foram retiradas e trituradas em PBS. Em seguida foram inoculados em placas com ágar Page recoberto com *E. coli* inativadas pelo calor, para a confirmação da infecção. Três dias após inoculação as placas foram avaliadas em microscópio óptico para a confirmação da infecção. Quando *Acanthamoeba* era isolada no meio seguia-se a axenização das amostras em meio PYG.

3.7. Cortes histológicos

Os órgãos retirados dos animais infectados foram preservados em paraformaldeído 4% e posteriormente foram feitos cortes histológicos para visualização dos protozoários nos tecidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho nove isolados de *Acanthamoeba* foram avaliados em relação à patogenicidade, através de testes *in vivo* e *in vitro*. A secreção de proteases foi estudada com o objetivo de correlacionar as proteases com o potencial patogênico destes isolados. Reuniu-se um grupo heterogêneo de isolados que variaram em relação ao local de isolamento: água de torneira, água de piscina, ar condicionados ou estojo de lentes de contato; origem do isolado: clínico ou ambiental; genótipo: T2, T4, T5 e T11; e características fisiológicas: termo e osmotolerância (Tabelas 2 e 9). Os resultados obtidos nos experimentos permitiram estabelecer comparações e correlações entre os isolados e diversos fatores, tais como: capacidade de infecção no modelo *in vivo* avaliado, secreção de proteases, citotoxicidade e perfil de resistência a temperatura e osmotolerância.

4.1. Avaliação do Modelo *in vivo* de Infecção Ocular por *Acanthamoeba* (Ceratite)

No modelo *in vivo* estudado, foram utilizados ratos *Wistar* adultos para avaliar o potencial dos isolados ambientais de *Acanthamoeba* (ACP1, ACM, TW79, PW-MH2 e LC30) e cepas ATCC (T4, AP2, AP4 e NEFF) para causar ceratite. Dentre todos os isolados testados, somente dois, TW79 e PW-MH2, foram capazes de estabelecer infecção na córnea, comprovada pela presença de lesão característica (Figura 5), bem como pelo reisolamento do protozoário através do cultivo do raspado da córnea do olho infectado (Figura 6). Outro estudo que utilizou um modelo *in vivo* semelhante para estabelecer infecção ocular em ratos apresentou uma taxa de infecção de 60%, bastante elevada quando comparada à obtida neste estudo, 22%

(Ren & Wu, 2010). Ao contrário do esperado, as cepas T4 e AP2, originalmente isoladas de casos clínicos de ceratite, não causaram infecção nos animais testados, o que pode ser explicado pelo fato destas cepas estarem sendo cultivadas há muito tempo em laboratório, o que pode torná-las avirulentas, como relatado para outros microrganismos (Borba, 2002).



Figura 5. Lesão de ceratite por *Acanthamoeba* em olho de rato no modelo *in vivo* de infecção ocular

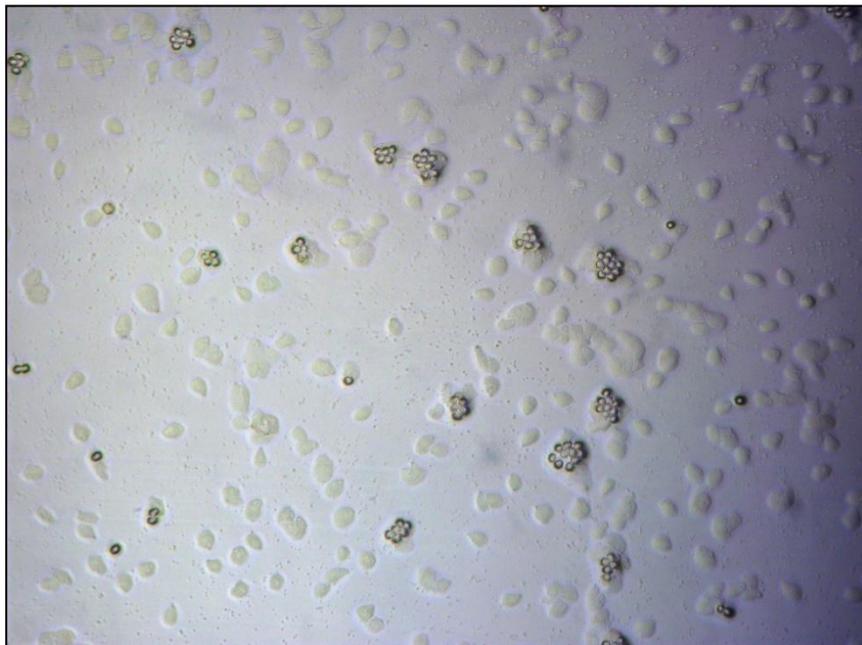


Figura 6. Trofozoítos de *Acanthamoeba* reisolados das lesões oculares em ratos (Aumento: 100x).

O isolado PW-MH2 foi capaz de estabelecer infecção no modelo avaliado. Uma lesão grande foi observada três dias após infecção. No 10º dia após infecção, houve uma significativa regressão da lesão, porém ainda foram reisolados trofozoítos de *Acanthamoeba* do raspado da córnea. No 20º dia após infecção, a lesão regrediu completamente e não houve crescimento do protozoário a partir do raspado da córnea. Os ratos foram acompanhados até o 30º dia sem mudança do quadro (Figura 7).

No caso da infecção pelo isolado TW79, na primeira observação dos olhos, um dia após infecção, não foi observada alteração aparente. No terceiro dia após a infecção, foi possível observar uma lesão extensa no olho infectado (direito), enquanto o olho controle (esquerdo), não apresentou alteração. No 20º dia após infecção a mesma lesão continuava presente e a partir daí começou a regredir, sendo que *Acanthamoeba* continuou sendo reisolada da lesão até o final do experimento.

REN & WU (2010) observaram que entre o 13º e 21º dia após infecção os ratos infectados começavam a se recuperar das lesões no olho gradualmente e no 30º dia, na maioria dos casos, já haviam se recuperado parcial ou totalmente da inflamação. Nesse mesmo estudo, observou-se que naqueles animais que não desenvolveram infecção após 24 horas da inoculação já havia cicatrização das lesões e em pouco tempo a opacidade aparente da córnea desaparecia, evento também observado em nossos experimentos. Para REN & WU (2010), a capacidade de recuperação dos animais sugere que esses possuem uma resposta imune mais efetiva que os humanos, embora esse fato ainda não possa ser explicado.

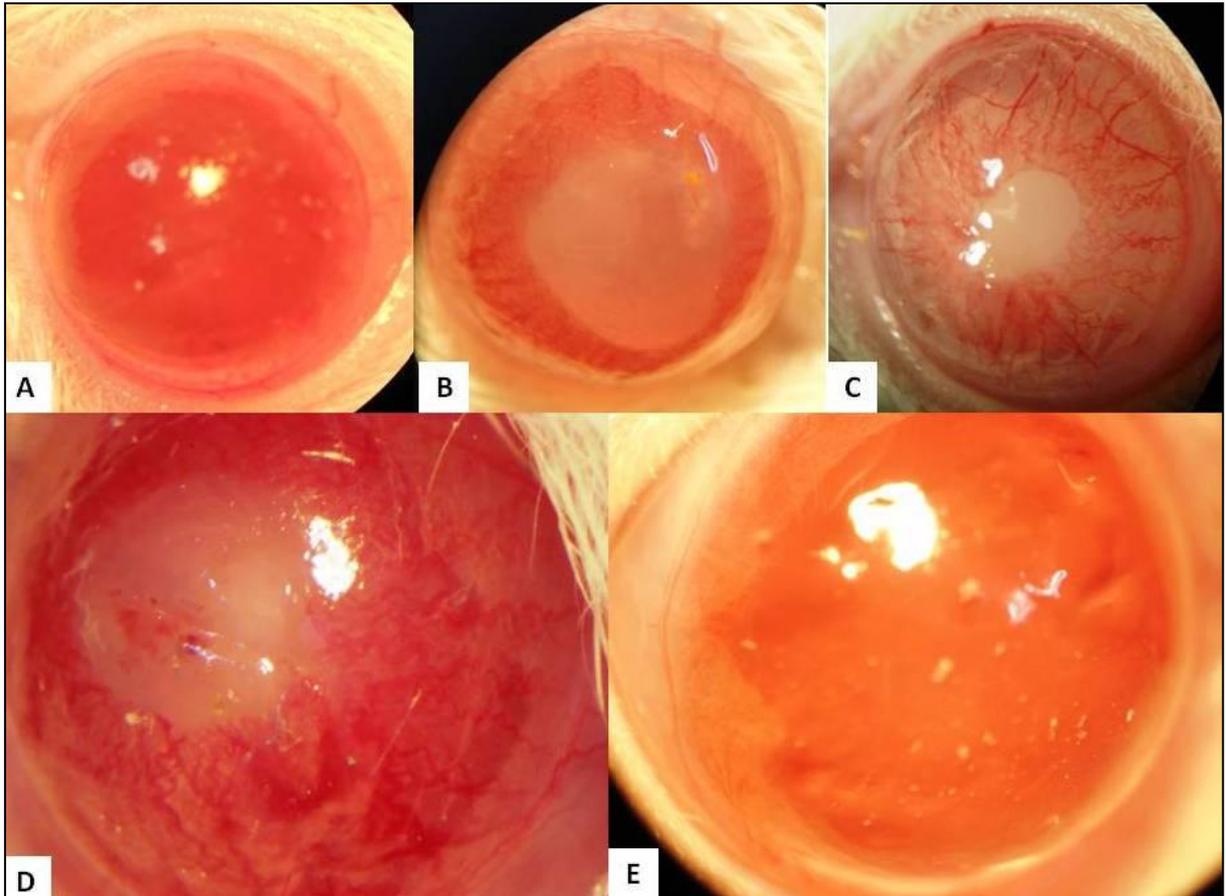


Figura 7. Evolução da infecção ocular pelo isolado PW-MH2. A: Primeiro dia após infecção; B: Terceiro dia após infecção; C: Sétimo dia após infecção; D: Décimo dia após infecção; E: Vigésimo dia após infecção, regressão total da lesão.

Após a morte dos animais, no caso daqueles em que a infecção foi confirmada, os olhos e o cérebro foram retirados, avaliados em relação a alterações morfológicas e presença do organismo. Os cérebros não apresentaram qualquer anormalidade morfológica. Em relação ao cultivo, não houve isolamento do protozoário dos cérebros e nem dos olhos dos ratos infectados com o isolado PW-MH2. O cultivo do tecido dos olhos dos ratos infectados com o isolado TW79 foi positivo para presença de *Acanthamoeba*.

O modelo *in vivo* de infecção ocular foi utilizado para avaliar a capacidade de isolados de *Acanthamoeba* ATCC, de origem clínica e do ambiente, e isolados ambientais, anteriormente caracterizados em relação ao potencial patogênico por experimentos *in vitro*, em infectar o olho e causar lesão do tipo ceratite. Os resultados obtidos através deste experimento demonstraram que apesar do modelo utilizado fornecer condições adequadas para que ocorra a infecção, como lesão

prévia nos olhos e utilização de isolados de origem clínica, nem sempre a infecção se estabelece nos olhos pelo método utilizado, portanto é adequado para diferenciar isolados em relação à capacidade natural de causar esse tipo de lesão.

Como vantagens do modelo animal utilizado podemos destacar a facilidade de avaliação, experimento de curta duração, boa reprodutibilidade, dispensa de imunossuppressores, facilidade de reisolar o protozoário das lesões, tamanho dos olhos dos animais, o pouco espaço exigido e a facilidade na obtenção e cuidado dos animais utilizados (Polat *et al.*, 2007; Ren & Wu, 2010). Outros modelos animais já foram utilizados com sucesso para infecções *in vivo* com *Acanthamoeba*, entre eles porcos, camundongos, hamsters, coelhos e gafanhotos (Alizadeh *et al.*, 1995; Polat *et al.*, 2007; Mortazavi *et al.*, 2009; Ren & Wu, 2010). Nos casos em que houve infecção, os parasitos foram isolados sem dificuldades pelo cultivo do raspado da córnea e a lesão facilmente visualizada, o que indica a simplicidade do método no aspecto da avaliação.

REN & WU (2010) estudaram e compararam três métodos de infecção *in vivo* para desenvolvimento da ceratite por *Acanthamoeba*. Nesse estudo ratos *Wistar* foram separados em três grupos, sendo que no primeiro grupo os animais tiveram suas córneas lesionadas e os trofozoítos de *Acanthamoeba* foram aplicados diretamente sobre a córnea; no segundo grupo, lentes de contato contaminadas com *Acanthamoeba* foram colocadas em contato com as córneas lesionadas dos animais e no terceiro grupo foram aplicadas injeções intra-estromais de trofozoítos nos olhos dos ratos. Todos os grupos foram infectados com o mesmo isolado, *Acanthamoeba castellanii*, grupo T4. Os autores verificaram taxas de infecção para os diferentes grupos na ordem de 60%, 80% e 100%, respectivamente.

O método de injeção intra-estromal de trofozoítos para estabelecer infecção ocular tem sido utilizado com sucesso em outros estudos *in vivo* (Badenoch *et al.*, 1990; Na *et al.*, 2001; Polat *et al.*, 2007), cujos resultados demonstraram que 100% dos animais desenvolvem infecção quando infectados desta maneira, mesmo com a utilização de diferentes isolados. NA *et al* (2001) estudaram a aplicação do MC dos cultivos de *Acanthamoeba* via intra-estromal, tendo observado os mesmos efeitos que os trofozoítos causaram na córnea em 100% dos animais avaliados. Este método de infecção, embora útil para estudar a evolução e caracterização das diferentes fases da infecção e os efeitos de novos agentes terapêuticos, não é adequado para discernir a patogenicidade dos isolados de *Acanthamoeba*.

Em nosso estudo tentamos estabelecer infecção ocular utilizando um método que se aproximasse ao máximo do que geralmente ocorre na natureza, pois nosso objetivo era avaliar a capacidade individual de cada isolado de *Acanthamoeba* aderir, invadir e estabelecer infecção. Por esse motivo também não foram utilizados imunossupressores nesse método, já que estudos anteriores relatam que este é um fator que pode facilitar a infecção tanto para amebas como co-infecções com outros microrganismos (Markowitz *et al.*, 1978; Bedenoch *et al.*, 1990). MATHERS *et al.* (1987) relatam que corticóides podem controlar parcialmente as respostas locais do hospedeiro induzidas pela necrose e outros fatores citolíticos liberados pelo parasito. Em infecções humanas o tratamento com corticosteróides pode inibir a transformação de trofozoítos em cistos, resultando em lesões graves na córnea (Lindquist, 1998).

Os genótipos T2, T3, T4, T5, T6 e T11 têm sido isolados clinicamente como agentes causadores da ceratite amebiana, sendo o genótipo T4 o principal causador desta patologia (Maghsood *et al.*, 2005; Booton *et al.*, 2005; Spanakos *et al.*, 2006; Ledee *et al.*, 2009). Estudos *in vivo* relatados na literatura, geralmente utilizam isolados ATCC previamente caracterizados e obtidos de casos clínicos de infecção. Na maioria são isolados da espécie *castellanii* pertencentes ao grupo T4 (Na *et al.*, 2001; Polat *et al.*, 2007; Ren & Wu, 2010). Os isolados PW-MH2 e TW79 do presente estudo, são provenientes do ambiente, tendo sido isolados de água de piscina e água de torneira, respectivamente. Em relação aos genótipos, os isolados PW-MH2 e TW79 pertencem aos grupos T5 e T2 respectivamente (Caumo *et al.*, 2009; Winck, 2011). Desta forma, em nosso trabalho foram produzidas lesões oculares a partir de isolados ambientais, ao contrário da maior parte dos trabalhos já publicados.

Correlacionando a origem dos isolados, casos clínicos ou do ambiente, com os resultados obtidos no teste *in vivo*, verificou-se que a capacidade de causar infecção é independente da origem dos isolados de *Acanthamoeba*, visto que as cepas T4 e AP2, originalmente isoladas de casos de ceratite, não causaram infecção. Muitos estudos tentam estabelecer diferenças entre isolados patogênicos e não patogênicos através de testes *in vitro*, tomando sempre como padrão cepas ATCC de isolados clínicos, considerados como patogênicos e cepas ATCC de isolados provenientes do ambiente, sendo padrão não patogênico (Khan *et al.*, 2000; Lorenzo-Morales *et al.*, 2005; Rocha-Azevedo & Silva-Filho, 2007). Entretanto, os

resultados apresentados em nosso estudo para a infecção *in vivo*, indicam que não é possível prever o potencial patogênico dos isolados de *Acanthamoeba* apenas com base em sua origem. A patogenicidade dos isolados está relacionada a diversos fatores, que podem incluir estado clínico do hospedeiro, condições do meio, e características fenotípicas e genotípicas do isolado, de maneira que diferentes situações podem favorecer, ou não, a infecção por *Acanthamoeba* (Walochnik *et al.*, 2000b, 2004).

4.2. Avaliação do Modelo *in vivo* de infecção por *Acanthamoeba* através de inoculação Intra-Nasal

A EGA ocorre predominantemente em indivíduos imunossuprimidos e, pela teoria mais aceita, atinge o SNC pela disseminação de *Acanthamoeba* pela via hematogênica, a partir de infecção nos pulmões quando da inalação do protozoário (Martinez & Visvesvara, 1997; Khan, 2006). Assim, no modelo *in vivo* de infecção através de inoculação intra-nasal, os ratos foram imunossuprimidos, sendo a dexametasona utilizada para tal fim (Markowitz *et al.*, 1978; Mathers *et al.*, 1987).

Modelos animais são essenciais para o entendimento da resposta do organismo às infecções causadas por *Acanthamoeba* (Khan, 2010). A EGA tem sido estudada em modelos *in vivo* utilizando animais como camundongos, ratos, macacos e insetos (Kong *et al.*, 1993; Cabral & Marciano-Cabral, 2004; Mortazavi *et al.*, 2009; Ren & Wu, 2010). Atualmente, no entanto, o modelo mais utilizado são os ratos, pois são fisiologicamente interessantes para estudar a relação parasito-hospedeiro (Khan, 2010). Nesse modelo, os animais são pré-tratados com corticóides antes da inoculação do protozoário pela via intra-nasal (Culbertson *et al.*, 1959; Markovitz *et al.*, 1978; Górnik & Kuzna-Grygiel, 2005).

As cepas ATCC de *Acanthamoeba* utilizadas neste estudo foram originalmente isoladas do ambiente, AP4 e NEFF, e de casos clínicos de ceratite, AP2 e T4. Diversos estudos que utilizam essas cepas as classificam como patogênicas (isolados de origem clínica) e não patogênicas (isolados do ambiente) e, de maneira geral, essas são tratadas como referências para perfis patogênicos e não patogênicos, respectivamente (Hadás & Mazur, 1993; Khan, 2006; Rocha-Azevedo & Silva-Filho, 2007). Considerando essas relações, em nosso trabalho

buscamos estabelecer padrões e diferenças de patogenicidade entre as quatro cepas ATCC estudadas utilizando um modelo *in vivo* de infecção via intra-nasal.

Todos os isolados ATCC estudados, T4, NEFF, AP2 e AP4, foram capazes de estabelecer infecção nos ratos. Dois isolados foram utilizados para reinoculação em animais, T4r e AP4r. Os isolados então chamados T4r e AP4r foram reinoculados em ratos para avaliação e comparação do modelo *in vivo* utilizando isolados recentemente retirados de lesão. Os outros reisolados, NEFFr e AP2r, foram utilizados nos demais experimentos.

Através dos resultados obtidos, pode-se observar que em casos de infecções disseminadas (isolados AP2 e NEFF) os ratos morreram naturalmente em um período menor de tempo (média de 26 dias), enquanto os animais com infecção comprovada apenas nos pulmões (AP4 e T4) sobreviveram aos 30 dias do experimento (Tabela 3). Nos ratos infectados com os reisolados T4r e AP4r, a média de sobrevivência foi de 17 dias após infecção, obtendo-se menor tempo de vida para os ratos em que comprovou-se infecção disseminada, inclusive no cérebro (Tabela 3). De maneira geral, houve redução do tempo de vida dos animais conforme a capacidade invasiva do isolado responsável pela infecção. Os dois animais utilizados como controle, sobreviveram aos 30 dias do experimento, no exame *post mortem* não foram evidenciadas lesões nos órgãos e no cultivo dos tecidos não houve crescimento de *Acanthamoeba*.

Sabe-se que em humanos a infecção por *Acanthamoeba* afeta diversos tecidos além do SNC, incluindo pele, fígado, pulmões, rins, glândulas supra renais, pâncreas, próstata, linfonodos e medula óssea (Khan, 2010; Young *et al.*, 2010). Em nosso trabalho, os resultados obtidos neste modelo de infecção demonstraram que independente da origem dos isolados de *Acanthamoeba*, todos foram capazes de estabelecer infecção nos animais que, em geral, atingiram os pulmões. Os animais infectados com as cepas padrão AP2 e NEFF tiveram infecções mais invasivas, sendo o parasito reisolado dos pulmões, fígado e rins, no caso de infecção com o isolado AP2, e dos pulmões e fígado na infecção com o isolado NEFF (Tabela 3). Ainda conforme os dados da Tabela 3, quando utilizados trofozoítos de *Acanthamoeba* recentemente reisolados de lesões, T4r e AP4r, os ratos desenvolveram uma infecção mais invasiva, atingindo diversos sítios do organismo dos ratos, inclusive o cérebro.

Tabela 3. Avaliação do modelo *in vivo* de infecção por *Acanthamoeba* através de inoculação intra-nasal

Isolados	Isolamento em órgãos					Dias de sobrevivência pós-infecção	Tipo de morte
	Pulmões	Cérebro	Fígado	Coração	Rins		
T4	+	-	-	-	-	30	CO2/Natural
AP4	+	-	-	-	-	30	CO2/Natural
AP2	+	-	+	-	+	22	Natural
NEFF	+	-	+	-	-	30	Natural
T4r	+	+	-	+	+	20	CO2/Natural
AP4r	+	+	+	+	+	15	Natural

(+): Reisolamento confirmado por crescimento da *Acanthamoeba* em cultivo. (-): Reisolamento negativo.

Embora os animais tenham sido acompanhados por 30 dias após a infecção e estivessem imunossuprimidos ao longo de todo este período, nenhum dos isolados originalmente mantidos no laboratório produziram infecção no cérebro. Decidiu-se então testar a hipótese de que os mesmos isolados mantidos em cultivos axênicos no laboratório, após uma breve passagem por modelo animal poderiam se tornar mais virulentos em uma segunda passagem. Foram testados dois reisolados, um de origem clínica (T4r) e outro de origem ambiental (AP4r), sendo novamente inoculados em animais.

Conforme nossos resultados demonstraram, a infecção causada pelos reisolados foi mais agressiva tendo atingido numerosos sítios no organismo e reduzido a sobrevivência dos animais (Tabela 3). *Acanthamoeba* T4r e AP4r causaram infecção disseminada que atingiu o cérebro dos ratos, sendo os sinais de doença percebidos 10 dias após a infecção, caracterizando-se principalmente por emagrecimento, pêlos arrepiados, diarreia e prostração. Possivelmente, a primeira infecção no modelo animal fez com que as amebas passassem a expressar fatores de patogenicidade que auxiliaram na invasão e estabelecimento da infecção na segunda passagem.

MORTAZAVI *et al.* (2009) estudando um modelo de infecção por *Acanthamoeba* em gafanhotos, observaram que estes insetos desenvolveram infecções disseminadas na hemolinfa, corpo gorduroso, tecidos musculares e cérebro. Para KHAN (2010), o fato deste protozoário causar infecções sistêmicas disseminadas reflete sua capacidade de sobreviver ao ataque do sistema imune inato e invadir o SNC, o que é consistente com os casos de EGA em seres humanos.

As diferentes capacidades invasivas que os isolados e reisolados estudados no presente trabalho apresentaram podem ser explicadas pela expressão de diferentes fatores de virulência que permitiram maior resistência para determinados isolados e, no caso dos reisolados, melhor capacidade de driblar as defesas do hospedeiro após a primeira infecção.

Em nosso trabalho também constatamos que os reisolados não possuíam especificidade em relação aos sítios de infecção no organismo, concordando com os resultados de MAZUR & JAZWIAK (1993), que reisolaram *Acanthamoeba* de infecções sistêmicas em camundongos, atingindo pulmões, rins, coração, fígado, diafragma, SNC e globo ocular. Após o reisolamento a partir de diferentes órgãos e reinoculação do protozoário em outros animais, os autores não observaram especificidade em relação ao órgão infectado. Em outro estudo foram comparadas as alterações patomorfológicas causadas nos órgãos pela infecção *in vivo* com cepas de baixa e alta virulência. Os autores relataram que a infecção com ambos os isolados resultou em infecção similar, porém as mudanças induzidas pela cepa de baixa virulência se desenvolveram mais tardiamente e foram menos extensas (Mazur *et al.*, 1999).

Com relação às lesões presentes nos órgãos retirados dos animais infectados em nosso estudo, as mesmas apresentavam-se disseminadas por todo pulmão sempre que havia infecção, independente do isolado responsável pela infecção. Dois tipos de lesões concomitantes e de características distintas foram observadas: lesões esbranquiçadas, difusas de aspecto leitoso e lesões amareladas, granulosas e de aspecto mateado (Figura 8). Nos fígados, quando as lesões estavam presentes (isolados AP2, NEFF, AP4r), estas eram difusas e amareladas (Figura 9). Todos os animais infectados tiveram seus cérebros removidos e observados. Somente os cérebros dos animais infectados com T4r e AP4r apresentaram morfologia diferenciada, com perda da arquitetura normal do tecido (Figura 10).

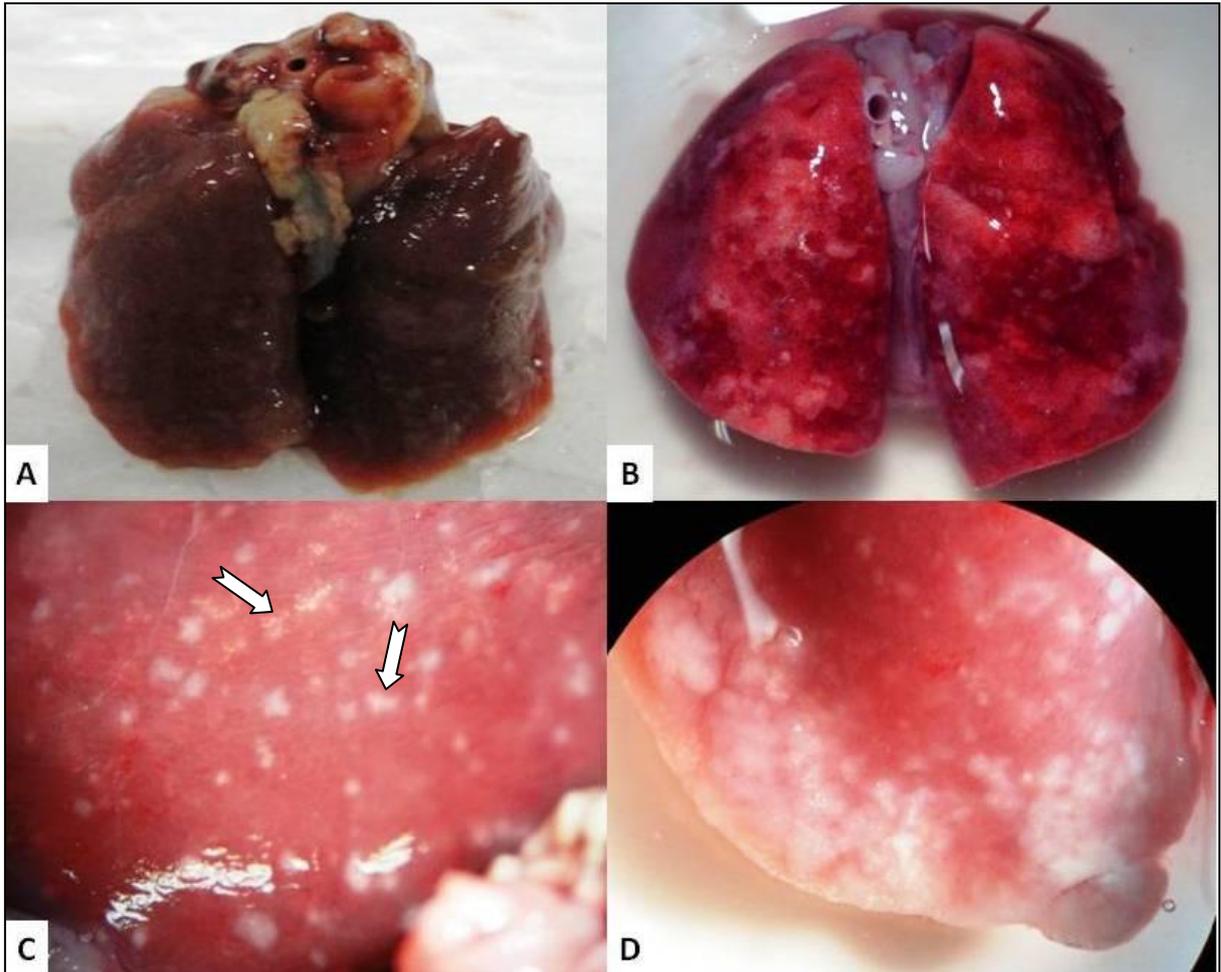


Figura 8. Pulmões de ratos infectados via intranasal com *Acanthamoeba*. A: Pulmão de rato não infectado; B: Pulmão com infecção confirmada por *Acanthamoeba*; C e D: Lesões no pulmão infectado. As setas indicam os diferentes tipos de lesões presentes no tecido.

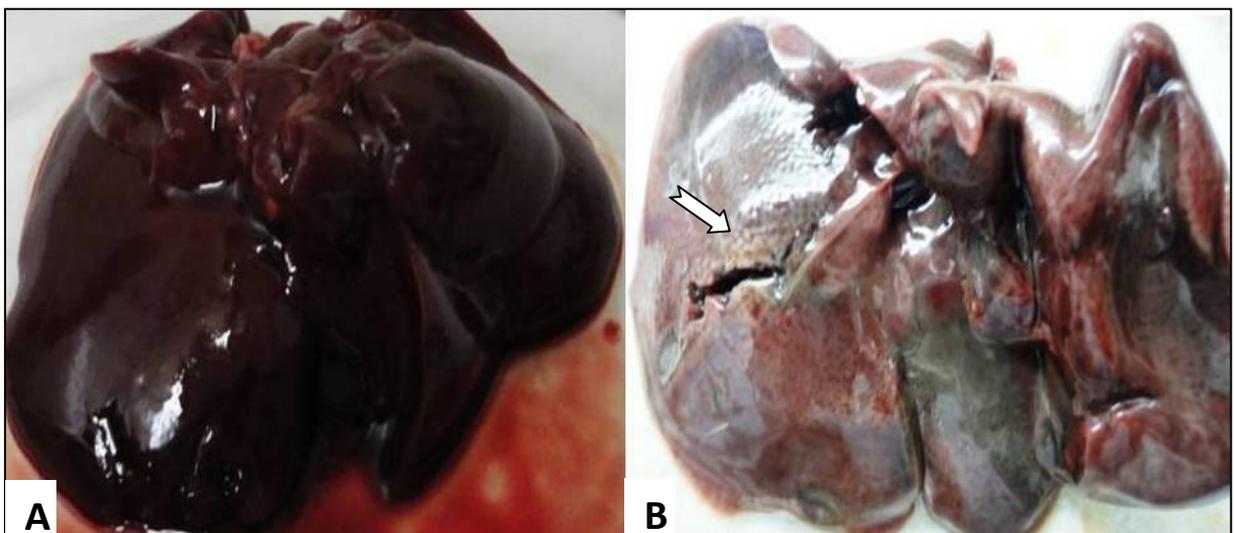


Figura 9. Fígados de ratos infectados via intranasal com *Acanthamoeba*. A: Fígado que não foi infectado pela *Acanthamoeba*. B: Fígado com infecção confirmada por *Acanthamoeba*. Setas indicam focos de lesões presentes no tecido.

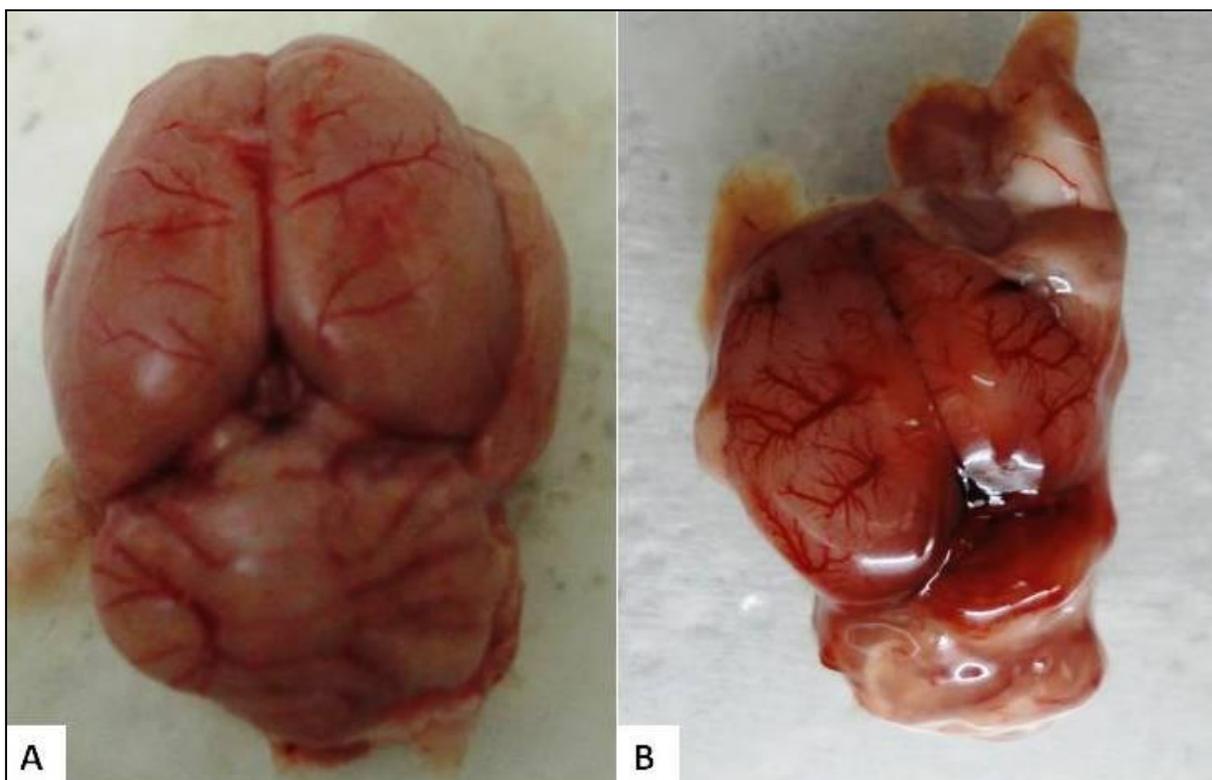


Figura 10. Cérebros dos ratos infectados via intranasal com *Acanthamoeba*. A: Cérebro com arquitetura tecidual normal e não infectado com *Acanthamoeba*; B: Cérebro com arquitetura tecidual alterada com infecção confirmada por *Acanthamoeba*.

GÓRNIK & KUZNA-GRYGIEL (2005) determinaram graus de virulência para seis cepas de *Acanthamoeba*, baseados no número de órgãos confirmadamente afetados e a extensão das alterações histopatológicas em decorrência de infecção sistêmica em ratos. Tomando-se este critério, pode-se classificar os isolados ATCC avaliados em nosso estudo com diferentes graus de virulência, sendo AP2 e NEFF mais virulentos e T4 e AP4 menos virulentos. Pode-se inferir ainda, que as cepas T4r e AP4r tornaram-se mais virulentas após a primeira infecção nos animais.

Foram feitos cortes histológicos dos órgãos infectados para visualização de *Acanthamoeba* (Figuras 11 e 12).

O genótipo T4 é conhecido como um dos mais presentes na natureza e tem maior incidência nos casos de infecções que atingem o homem (Maghsood *et al.*, 2005; Booton *et al.*, 2005). Em nosso trabalho, todos os isolados ATCC utilizados pertenciam ao grupo T4 e pelo menos os isolados T4 e AP2 já possuíam histórico de patogenicidade, tendo em vista que foram originalmente isolados de casos de ceratite. Já os isolados AP4 e NEFF era ambientais e não há relato de sua

patogenicidade. Em nosso estudo relatamos pela primeira vez o potencial patogênico *in vivo* de cepas ATCC isoladas do ambiente, NEFF e AP4, salientando a importância do estado clínico do hospedeiro para o estabelecimento da infecção por *Acanthamoeba*. Certamente a imunossupressão dos animais favorece o estabelecimento da infecção, salientando a importância de estudos epidemiológicos que visem alertar a população em relação ao risco que este protozoário pode oferecer à saúde humana.

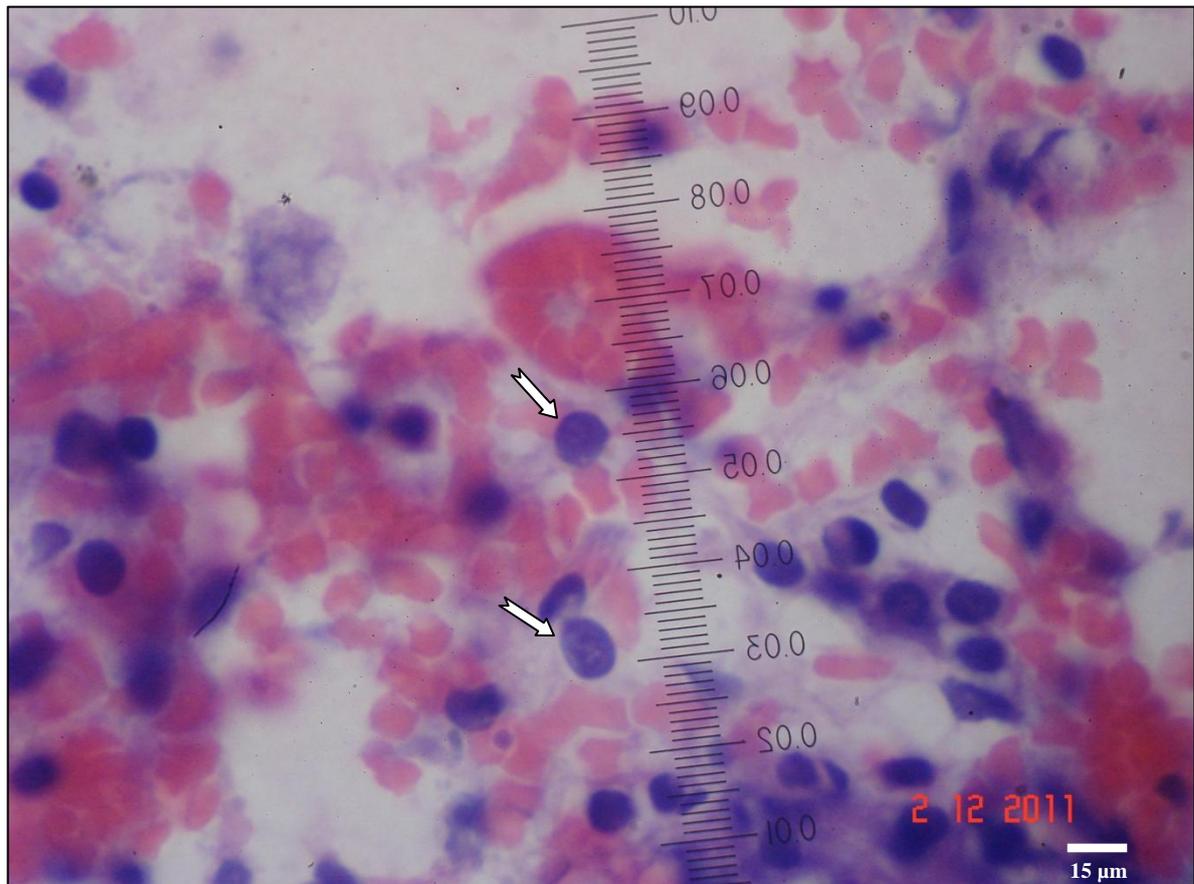


Figura 11. Corte histológico do tecido pulmonar infectado por *Acanthamoeba*. As flechas apontam dois trofozoítos. Corte histológico de 20 µm de espessura. Imagem em microscópio óptico, aumento de 400X, coloração hematoxilina-eosina.

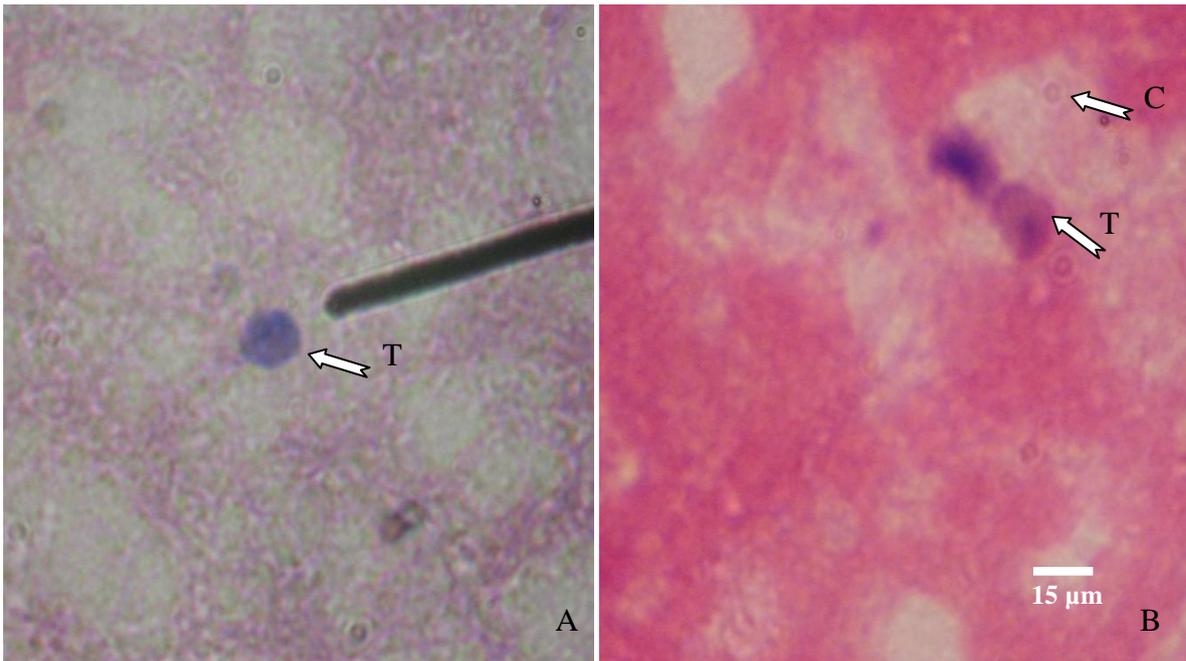


Figura 12. Corte histológico de Cérebro (A) e Fígado (B) infectado por *Acanthamoeba*. As setas apontam dois trofozoítos (T) e cistos (C) identificados. Corte histológico de 20 μm de espessura. Imagem em microscópio óptico, aumento de 400X, coloração hematoxilina-eosina.

4.3. Proteases secretadas por *Acanthamoeba*

O conhecimento a respeito dos fatores que de fato definem a patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* é limitado. Sabe-se que, independente da espécie ou grupo T ao qual pertençam, cada cepa pode desenvolver características distintas de patogenicidade, restringindo a utilização da classificação genotípica na determinação ou diferenciação de isolados patogênicos e não patogênicos (Mazur *et al.*, 1995; Walochnik *et al.*, 2000a; Khan, 2001; Duarte, 2010). Assim, outras características vêm sendo exploradas com o objetivo de estabelecer um marcador da patogenicidade de *Acanthamoeba*. Como exemplo, pode-se citar a produção de proteases, extensivamente estudada em trabalhos recentes (Lorenzo-Morales *et al.*, 2005; Clarke & Niederkorn, 2006; Kim *et al.*, 2006; Sissons *et al.*, 2006; Rocha-Azevedo & Silva-Filho, 2007;). Alguns autores ainda destacam a importância epidemiológica em estabelecer diferenças de patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* (Jeong *et al.*, 2007), já que a partir destes dados pode-se entre outras coisas, estabelecer áreas de risco para contaminação. Considerando todos esses fatores, este trabalho buscou identificar e comparar o perfil de proteases secretadas

por *Acanthamoeba* isoladas de casos clínicos e do ambiente visando estabelecer a relação das proteases com a patogenicidade do isolado.

4.3.1. Perfil de Proteases em Gel de Zimograma dos isolados de Acanthamoeba utilizados no Modelo de Infecção Ocular

O MC de cada um dos isolados de *Acanthamoeba* estudados, contendo 0,5 mg/mL de proteínas, foi aplicado no gel de zimograma com gelatina para avaliação da presença de proteases.

Na Figura 13 pode ser observado o gel de zimograma com o perfil de proteases para cada isolado avaliado. Todos os isolados estudados demonstraram atividade proteolítica, com a presença de pelo menos duas bandas de proteases bastante evidentes. Os isolados apresentaram diferentes perfis de atividade proteolítica no gel, porém algumas bandas em comum. Cinco dentre os nove isolados, T4, AP4, NEFF, PW-MH2 e LC30, apresentaram duas bandas com atividade bastante definida, com pesos moleculares estimados de 120 e 240 kDa. Os isolados AP2, ACP1, ACM e TW79 possuíam perfis bastante distintos tanto entre si quanto quando comparados aos demais isolados, com bandas apresentando pesos moleculares estimados que variaram de 70 a 200 kDa, destacando-se duas bandas de aproximadamente 100 e 130 kDa no isolado AP2, uma banda de 100 kDa no isolado ACP1, uma de 135 kDa em ACM e uma de 70 kDa no isolado TW79.

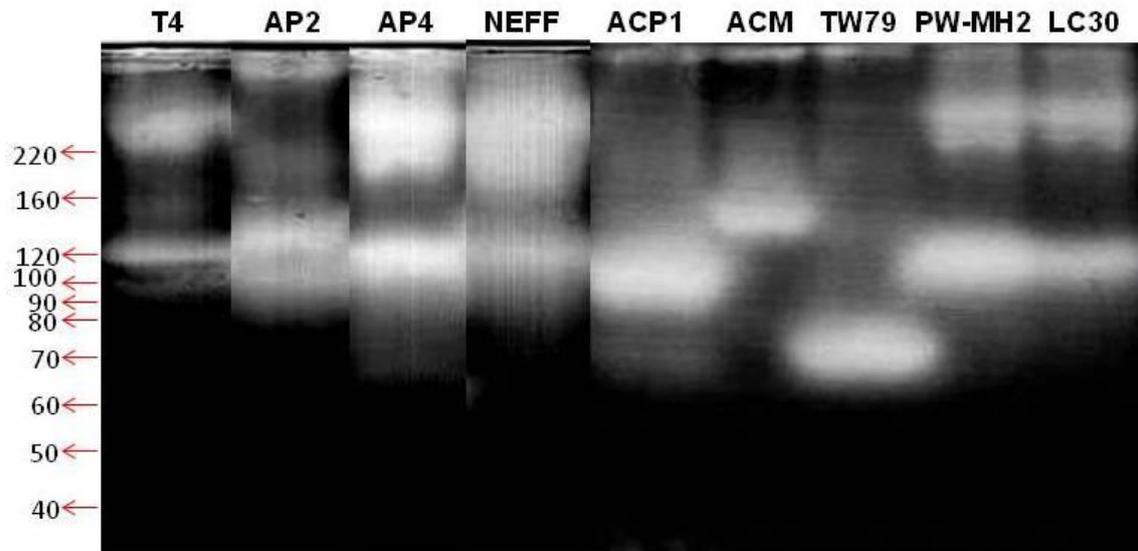


Figura 13. Perfil de atividade proteolítica em gel de zimograma contendo gelatina dos diferentes isolados de *Acanthamoeba* estudados no modelo *in vivo* de infecção ocular. Peso molecular estimado das bandas indicado à esquerda (kDa).

Conforme a Figura 13 demonstra, os isolados secretaram um número de proteases variável, com tamanhos distintos, independente dos isolados pertencerem ao mesmo genótipo, T4, AP2, AP4 e NEFF, ou mesma espécie, AP2 e AP4, por exemplo. Vale observar, contudo, que essa não é uma regra, tendo-se observado que os isolados PW-MH2 e LC30, ambos pertencentes ao genótipo T5, apresentaram perfil de proteases idêntico em gel de zimograma.

Muitos trabalhos têm demonstrado a importância do processo de adesão, atividade proteolítica e fagocitose no efeito citopático que *Acanthamoeba* pode exercer sobre diversos tipos celulares e a influência destes processos na invasão tecidual e disseminação da infecção (Taylor *et al.*, 1995; Khan, 2001; Hurt *et al.*, 2003; Alsam *et al.*, 2004; Rocha-Azevedo *et al.*, 2006; Clarke & Niederkorn, 2006). Em relação à atividade proteolítica, quando comparamos os perfis de proteases em gel de zimograma dos isolados de *Acanthamoeba* estudados no modelo de infecção ocular, nenhuma protease comum a todos os isolados foi identificada. Somado a isso, não foi observada uma protease que fosse característica de isolados comprovadamente patogênicos pelo teste *in vivo*, TW79 e PW-MH2, a qual talvez pudesse atribuir um papel diferencial na patogenicidade, não sendo possível associar a produção e secreção de proteases dos isolados estudados à patogenicidade *in vivo*, ao contrário do que muitos autores sugerem (Lorenzo-Morales *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; de Souza Carvalho *et al.*, 2011). Neste

sentido, ROCHA-AZEVEDO & SILVA-FILHO (2007) afirmaram que somente o perfil de proteases não é suficiente para distinguir isolados patogênicos e não patogênicos. Entretanto seria muito interessante estabelecer um grupo de características fisiológicas capaz de ser utilizado para este fim.

4.3.2. Perfil de Proteases em Gel de Zimograma dos isolados e reisolados de *Acanthamoeba* utilizados no Modelo de Infecção Intra-Nasal

Na Figura 14 observa-se o gel de zimograma com gelatina apresentando o perfil de proteases do MC dos isolados de *Acanthamoeba* ATCC T4, AP2, AP4 e NEFF mantidos no laboratório de parasitologia e destes mesmos isolados após serem reisolados de lesões nos órgãos de ratos infectados, T4r, AP2r, AP4r e NEFFr.

Todos os isolados, T4, AP2, AP4 e NEFF, apresentaram atividade proteolítica, representada pela presença de diversas bandas no gel de zimograma (Figura 14). As massas moleculares das bandas de proteases foram estimadas e variaram de 100 a 240 kDa. Comparando-se a atividade proteolítica em gel, somente os isolados AP4 e NEFF possuem perfis relacionados, ambos apresentaram duas bandas de atividade, uma de 120 e outra de 240 kDa. No perfil da cepa de *Acanthamoeba* AP2, três bandas com aproximadamente 100, 130 e 180 kDa podem ser observadas. Em conjunto, os dados indicam que a secreção de proteases não estava relacionada ao genótipo dos isolados, visto que os quatro isolados pertencem ao grupo T4 e também não pode ser associada à espécie, já que os isolados AP2 e AP4, *A. polyphaga*, e T4 e NEFF, *A. castellanii*, secretam diferentes enzimas (Figura 14).

As proteases secretadas pelos isolados estudados em relação aos resultados de infecção *in vivo* através de inoculação intra-nasal de cada isolado, não demonstraram um papel definido na patogenicidade. Além do perfil proteolítico em gel não ter sido igual para todos os isolados ATCC estudados, nenhuma protease secretada é comum a todos eles, tornando difícil estabelecer relação entre o perfil de proteases, ou uma protease específica e a patogenicidade dos isolados.

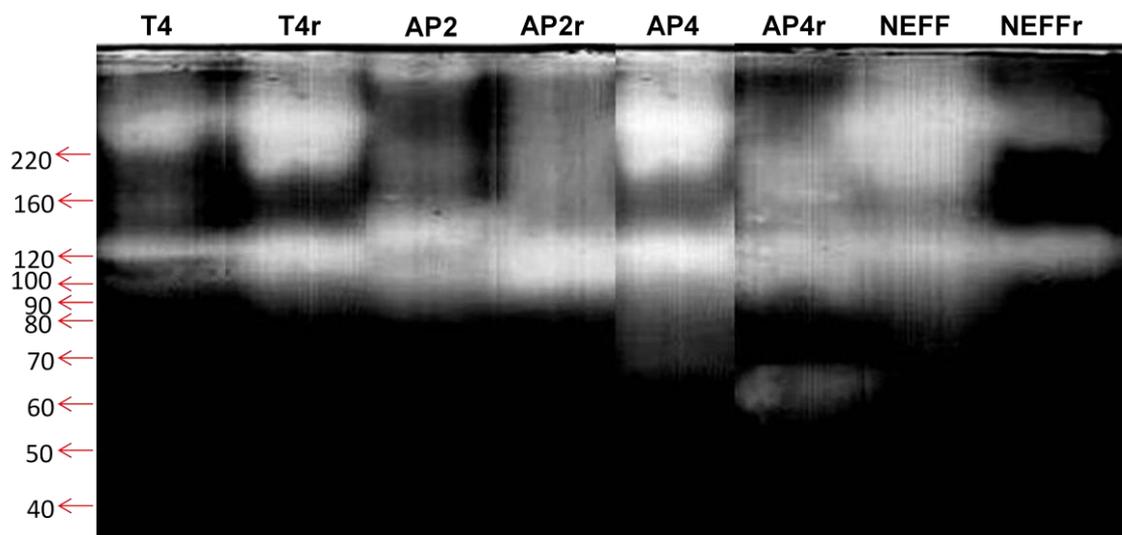


Figura 14. Perfil de atividade proteolítica em gel de zimograma contendo gelatina dos diferentes isolados de *Acanthamoeba* utilizados para infecção intranasal no modelo *in vivo*. Peso molecular estimado das bandas indicado à esquerda (kDa).

Para verificar se as diferenças de patogenicidade que os isolados e reisolados apresentaram no teste *in vivo* (Tabela 3) estava relacionada a secreção de proteases, comparamos o perfil de atividade proteolítica em gel de zimograma dos mesmos. Para a maioria dos isolados e reisolados foram observadas diferenças em relação ao número e massa molecular das bandas de hidrólise. Contudo, o perfil do reisolado NEFFr apresentou-se idêntico ao perfil do isolado originalmente presente no laboratório NEFF, com uma banda de 120 kDa e outra de 240 kDa (Tabela 6 e Figura 14).

Não se pode afirmar, entretanto, que a secreção diferencial de proteases está relacionada à patogenicidade diferenciada apresentada pela cepa T4 comparada à T4r e AP4 comparada à AP4r no teste *in vivo*. Estabelecer esta relação é especialmente difícil pelo fato dos perfis proteolíticos dos reisolados T4r e AP4r não terem apresentado nenhuma protease em comum, embora neste estudo tenham desenvolvido infecções similares nos animais.

Certamente o primeiro contato com os animais induziu alterações na expressão de proteases nos isolados estudados. Mas se sabe que as proteases secretadas por *Acanthamoeba* exercem diversas funções de importância para sua sobrevivência. Um estudo com a cepa ATCC não patogênica 30872, identificou uma banda com atividade no perfil do zimograma. Os autores atribuíram a esta protease

atividades importantes relacionadas à fisiologia do protozoário, como degradação extracelular, alimentação e sobrevivência no ambiente (Rocha-Azevedo & Silva-Filho, 2007).

Alguns estudos já observaram que após contato com monocamadas de células microgliciais BV-2, isolados de *Acanthamoeba culbetsoni* não apresentaram expressão diferenciada de proteases extracelulares (Harrison *et al.*, 2010). Entretanto, os resultados do presente estudo sugerem mudanças importantes após os isolados terem sido inoculados via intra nasal em ratos e reisolados de lesões nos órgãos. Muitos autores destacam a importância do processo de adesão de *Acanthamoeba* a outras células para estímulo de secreção de proteases. O contato celular pode ter um papel fundamental na patogênese de *Acanthamoeba* e as proteases poderiam dar seguimento aos eventos (Harrison *et al.*, 2010). Talvez seja necessário mais que somente o contato com monomadas celulares para que haja alterações perceptíveis na secreção de proteases de isolados. O contato íntimo com outro organismo, no caso do experimento *in vivo*, poderia estimular essas mudanças já que neste caso, além do tempo de exposição ser maior que em casos de testes *in vitro* com monocamadas celulares, ainda existem muitos fatores intrínsecos do hospedeiro com os quais as amebas precisam lidar.

ROCHA-AZEVEDO & SILVA-FILHO (2007), estudaram proteases secretadas pelos isolados padrão de *Acanthamoeba* ATCC 30461 (AP2) e 30872 (AP4) com o objetivo de estabelecer diferenças entre isolados considerados patogênicos e não patogênicos. No estudo os autores identificaram diferenças em relação ao perfil apresentado no gel de zimograma, sendo que o isolado considerado patogênico, ATCC 30461, apresentou maior número de bandas no gel, revelando uma atividade proteolítica maior que o isolado considerado não patogênico, o que os autores relacionaram a patogenicidade do isolado 30461. LORENZO-MORALES *et al.* (2005) estudaram o efeito de siRNA sobre a produção de proteases extracelulares dos isolados ATCC 30461 (patogênica) e 30010 (não patogênica) e concluíram que na presença de siRNA os isolados secretavam menos proteases e apresentavam efeitos citopáticos menores sobre monocamadas celulares. Em nosso estudo os isolados AP2 (30461) e AP4 (30872) também foram avaliados e, tal como os outros autores demonstraram, os isolados apresentaram perfis de proteases diferentes, tendo o AP2 apresentado um maior número de bandas de proteases do que o

isolado AP4 (Figura 13). Entretanto, não foi possível relacioná-las a patogenicidade *in vivo* dos isolados, onde foi demonstrado que ambos os isolados podem causar infecções sistêmicas pelo modelo de infecção intranasal.

MITRO *et al.* (1994) avaliaram a atividade colagenolítica de enzimas secretadas pelo isolado ATCC 30461, tendo identificado três proteases diferentes com capacidade de degradar colágeno. Essa atividade poderia estar associada à patogênese da ceratite, entretanto os autores sugeriram estudos *in vivo* para comprovar esta relação. Embora essa cepa tenha sido originalmente isolada de um paciente com ceratite e o perfil de proteases secretadas seja diferente daquele observado para o isolado do ambiente (AP4), em nosso trabalho, quando colocado em contato com a córnea lesionada de ratos, o isolado padrão ATCC 30461 (AP2) não estabeleceu infecção ocular. Entretanto, este mesmo isolado sendo inoculado em animais imunossuprimidos, via intra-nasal, causou infecção, atingindo pulmões, rins e fígado, com inúmeras lesões especialmente nos pulmões.

A diferença de patogenicidade observada para o isolado AP2 nos dois modelos *in vivo* aplicados pode ser explicada pela preferência do isolado por sítios de infecção específicos; o fato da cepa ATCC 30461 ser um isolado de baixa virulência (Visvesvara *et al.*, 1975) poderia favorecer infecções em animais imunossuprimidos, como os utilizados no modelo de infecção via intra nasal. Muitos estudos sugerem que ocorre perda de fatores de virulência em decorrência de cultivos prolongados de microrganismos em laboratório. A capacidade de colonização e a patogenicidade do *Staphylococcus aureus* são associadas aos seus fatores de virulência, os quais têm papel relevante na adesão celular, na captação de nutrientes e na sua evasão da resposta imunológica do hospedeiro (Santos *et al.*, 2007). A análise da patogenicidade de *Paracoccidioides brasiliensis* em modelo animal mostrou que as cepas preservadas por mais de 30 anos em laboratório tornaram-se avirulentas. A análise das cepas demonstrou que o método de estocagem levou à perda de fatores de virulência, os quais são fundamentais para o estabelecimento da doença (Borba, 2002). Mais estudos são necessários para esclarecer a influência destes fatores nos teste *in vivo* com *Acanthamoeba*.

Muitos autores têm estudado a secreção de proteases, tentando estabelecer a importância dessas moléculas na patogenicidade diferencial de isolados de *Acanthamoeba*. Na Tabela 4 estão resumidos alguns destes estudos. Conforme pode ser observado na tabela, uma variedade de proteases foi identificada,

apresentando tamanhos e classes distintas, com atividade frente a vários substratos. Utilizando testes *in vitro*, diversos trabalhos relacionaram a presença de proteases aos efeitos citopáticos dos isolados (Cho *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2006; Harrison *et al.*, 2010; de Souza Carvalho *et al.*, 2011). Ainda, conforme a Tabela 4 apresenta, a produção e a atividade de proteases não demonstram relação com as espécies ou genótipos o que corrobora os resultados obtidos para os isolados estudados neste trabalho. Vale observar que em relação ao peso molecular das bandas de proteases em zimogramas é muito possível que haja disparidade entre o peso molecular de bandas iguais em diferentes estudos, o que pode-se atribuir à composição do MC, diferentes isolados utilizados ou ao zimograma em si, pela composição do gel e miliamperagem utilizada (Harrison *et al.*, 2010). Além disso, os pesos moleculares podem ser somente estimados, no caso de bandas no gel de zimograma, já que o padrão de peso molecular para proteínas não pode ser aplicado em géis de zimograma.

A produção de proteases não é um mecanismo particular de *Acanthamoeba*, tendo sido bem relatada em bactérias e outros parasitos (Hidalgo-Grass *et al.*, 2006; Galván-Moroyoqui *et al.*, 2008; Mejri & Gottstein, 2009). A atividade proteolítica apresentada pelos isolados de *Acanthamoeba* pode ser associada a diversas funções fisiológicas, como processos de alimentação, sobrevivência no meio ambiente e digestão extracelular (Rocha-Azevedo & Silva-Filho, 2007), contudo a grande maioria dos trabalhos tem identificado funções importantes que podem estar relacionadas a patogênese de doenças como ceratite e EGA, entre elas a capacidade de degradar moléculas como colágeno, imunoglobulinas, laminina, fibronectina, elastina, plasminogênio, caseína, hemoglobina, albumina, fibrinogênio e citocinas, além de forte atividade citotóxica sobre células da glia, fibroblastos, células epiteliais e da córnea (Mitro *et al.*, 1994; Cho *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2000; Rosenberg, 2002; Alsam *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Sissons *et al.*, 2006; Harrison *et al.*, 2010). Neste estudo não pudemos estabelecer qualquer relação entre genótipo, perfil de proteases secretadas e patogenicidade dos isolados pelos testes *in vivo*, entretanto, segundo SISSONS *et al.* (2006), a extensa atividade de proteases na degradação de componentes da matriz extracelular afeta propriedades funcionais e estruturais de tecidos, culminando em perda funcional. Apesar de não ser conhecido ao certo o papel das proteases de *Acanthamoeba*, estas certamente exercem funções importantes durante o processo de infecção (Rosenberg, 2002).

Tabela 4. Proteases identificadas em isolados de *Acanthamoeba* e atividade relacionada

REFERÊNCIA	ISOLADO ESPÉCIE / GENÓTIPO	PROTEASE		ATIVIDADE	pH ÓTIMO	TEMPERATURA ÓTIMA
		PESO MOLECULAR (kDa)	CLASSE			
Lorenzo- Morales et al., 2005	<i>A. castellanii</i> ATCC 30010 / T4	NI	Serino	Citopatogenicidade frente a células da córnea humana	NI	NI
	<i>A. polyphaga</i> ATCC 30461 / T4		Serino			
Rocha- Azevedo & Silva-Filho, 2007	<i>A. polyphaga</i> ATCC 30461 / T4	Diversas bandas entre 27 e 35 27 e 30	NI	Citopatogenicidade frente a monocamadas de células epiteliais e degradação de matriz de colágeno. Funções Fisiológicas	NI	NI
	<i>A. polyphaga</i> ATCC 30872 / T4					
Kim et al., 2006	<i>A. healyi</i>	33	Serino	Degradação de Colágeno tipo IV e I, Laminina, Fibronectina, Albumina, Fibrinogênio, Imunoglobulinas e Hemoglobina	8.5	60
	<i>A. lugdunensis</i>	33	Serino		8.5	55
	<i>A. castellanii</i> NEFF / T4	33	Serino		8.0	55
Sissons et al., 2006	T1	150 130	Serino Metalo	Degradação de colágeno I e III, Elastina, Plasminogênio, Caseína e Hemoglobina. Citopatogenicidade frente a células HBMEC.	de 7.0 a 11.0	50
Cho et al., 2000	<i>A. castellanii</i>	42	Serino	Degradação de colágeno tipo I. Citopatogenicidade frente a células epiteliais da córnea humana, de coelhos e contra fibroblastos.	8.0	50

Magliano et al., 2009	<i>A. polyphaga</i> ATCC 30461 / T4 T4 (isolado ambiental)	37, 47, 80, 90, 120 e 150	Serino	NI	8.0	28 e 37
Harrison et al., 2010	<i>A. culbertsoni</i>	40, 50, 70, 80, 90, 100 e 150	Serino	Citopatogenicidade frente a células microgliais e Degradação de citocinas e quimiocinas	NI	NI
Mitro et al., 1994	<i>A. polyphaga</i> ATCC 30461 / T4	36, 49 e 66	Serino Cisteíno	e Degradação de colágeno	7.0	
Na et al., 2001	<i>A. castellanii</i>	12	Serino	Degradação de colágeno, fibronectina, imunoglobulina (Ig)A e G, plasminogênio, hemoglobina e proteínas da córnea de coelho. Citopatogenicidade frente a células VERO e HeLa.	8.5	55
Kim et al., 2003	<i>A. lugdunensis</i>	33	Serino	Colágeno tipo I e IV, IgA, IgG, Fibronectina, Fibrinogênio, Albumina, Hemoglobina,	8.5	55
Khan et al., 2000	<i>Acanthamoeba</i> sp.	107	Serino	Citopatogenicidade frente a células epiteliais da córnea	de 5.0 a 9.5	
NI: Não Informado.						

4.3.3. Caracterização das proteases secretadas pelos isolados de Acanthamoeba estudados no Modelo de Infecção ocular

A caracterização das proteases foi realizada utilizando-se inibidores específicos para serino proteases (PMSF) e para metalo proteases (EDTA). As Figuras 15 e 16 apresentam o perfil do zimograma dos isolados na presença dos inibidores EDTA e PMSF, respectivamente.

Conforme a Figura 15 demonstra, o EDTA foi capaz de inibir a atividade das proteases da maioria dos isolados, que tiveram bandas de proteases total ou parcialmente inibidas pelo EDTA, indicando a possível presença de metalo-proteases no MC dos isolados estudados. A banda de 240 kDa dos isolados PW-MH2 e LC30 foi completamente inibida pelo EDTA, enquanto a banda de 240 kDa dos isolados T4, AP4 e NEFF tiveram apenas a atividade reduzida na presença desse inibidor. Já a banda de 120 kDa foi totalmente inibida pelo EDTA somente nos isolados T4, NEFF, PW-MH2 e LC30, permanecendo com a mesma atividade no perfil do isolado AP4. Os isolados AP2, ACM e TW79 não tiveram seus perfis proteolíticos em gel de zimograma alterados na presença de EDTA. Em relação ao isolado ACP1, na presença de EDTA a banda de 100 kDa teve sua atividade visualmente reduzida no gel (Figura 15).

O inibidor PMSF foi utilizado para caracterizar as enzimas no gel, tendo sido observado que na presença desse inibidor todas as bandas de todos os isolados estudados foram inibidas, inclusive aquelas que já haviam sido inibidas pelo EDTA (Figura 16), sugerindo que os isolados secretam predominantemente serino proteases.

A Tabela 5 apresenta um resumo das principais proteases secretadas pelos diferentes isolados, tanto da amostra na ausência de inibidores quanto na presença de EDTA e PMSF.

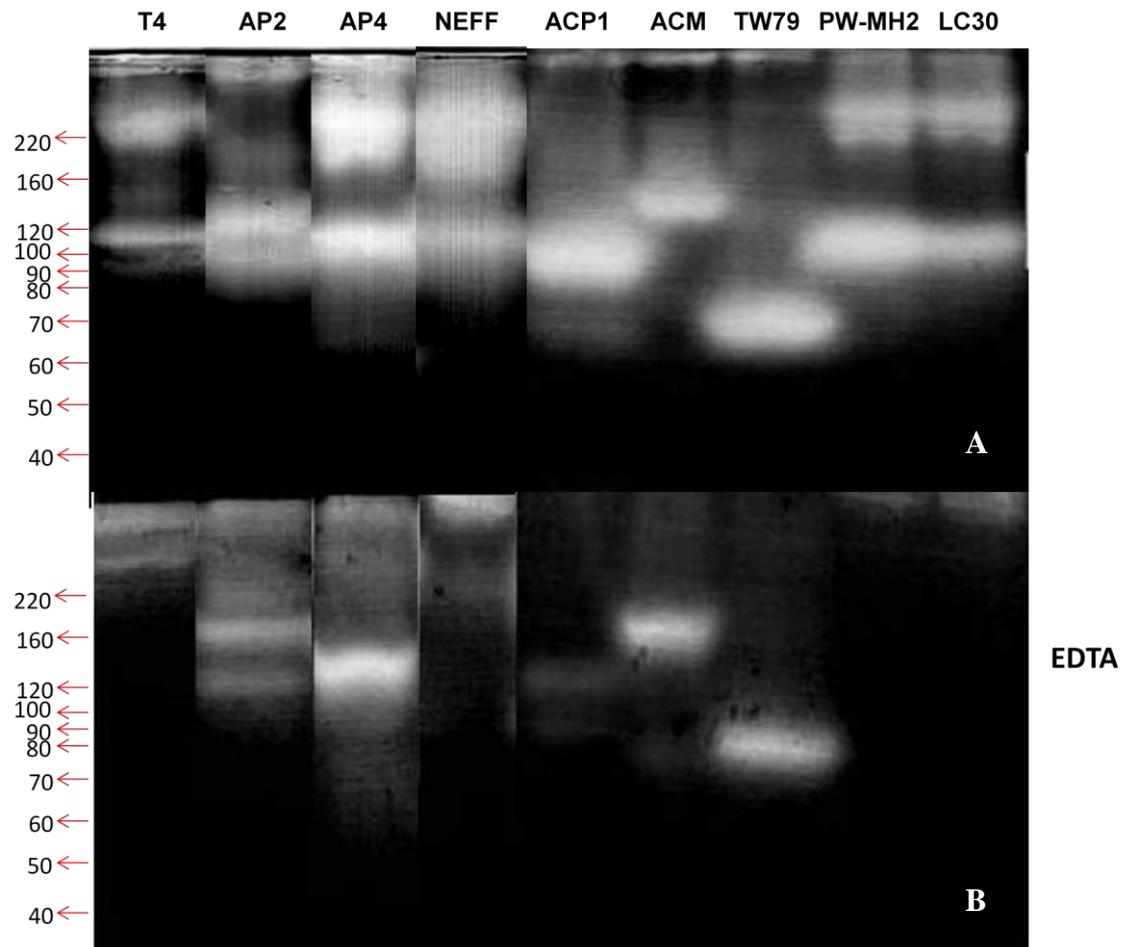


Figura 15. Perfil de atividade proteolítica em gel de zimograma contendo gelatina dos diferentes isolados de *Acanthamoeba* estudados no modelo *in vivo* de infecção ocular. A: sem incubação com EDTA e B: Pré-incubados com EDTA. Peso molecular estimado das bandas indicado à esquerda (kDa).

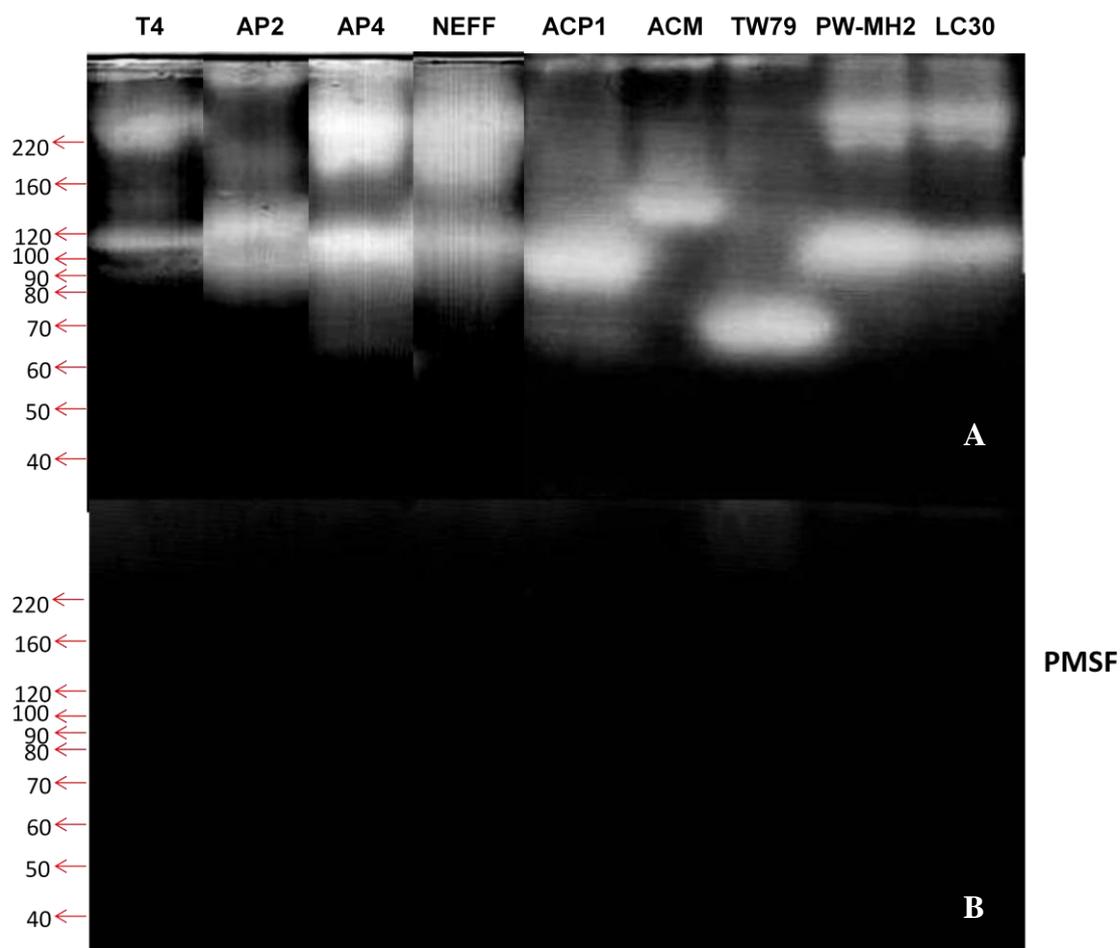


Figura 16. Perfil de atividade proteolítica em gel de zimograma contendo gelatina dos diferentes isoaldos de *Acanthamoeba* estudados no modelo *in vivo* de infecção ocular. A: sem incubação com PMSF e B: pré-incubados com PMSF. Peso molecular estimado das bandas indicado à esquerda (kDa).

Tabela 5. Perfil das principais proteases secretadas pelos isolados de *Acanthamoeba* estudados no modelo *in vivo* de infecção ocular, conforme bandas (PM) presentes no gel de zimograma na ausência e na presença de inibidores de proteases específicos.

isolado	Amostras sem inibidores	Amostras + EDTA	Amostras + PMSF
T4	240, 140, 120	240*	-
AP2	180, 130, 100	180, 130, 100	-
AP4	240, 120	240*, 120	-
NEFF	240, 120	240*	-
ACP1	100, 70	100*, 70	-
ACM	135	135	-
TW79	70	70	-
PW-MH2	240, 120	-	-
LC30	240, 120	-	-

*Indica que a banda está presente, porém com menor atividade. Os valores correspondem aos pesos moleculares estimados das bandas (Kda).

4.3.4. Caracterização das proteases secretadas pelos isolados de *Acanthamoeba* estudados no Modelo de Infecção Intra-Nasal

As Figuras 17 e 18 apresentam o perfil do zimograma dos isolados utilizados no modelo de infecção intra-nasal na presença dos inibidores EDTA e PMSF, respectivamente.

Na Figura 17 as amostras pré-incubadas com o inibidor de metalo-proteases (EDTA) e posteriormente migradas em gel de zimograma podem ser visualizadas, demonstrando que o EDTA é capaz de inibir algumas bandas, mas não todas as que estão presentes no perfil dos isolados estudados. As proteases no MC do isolado AP2 e reisolado AP4r não foram afetadas pela presença desse inibidor, sugerindo que esses isolados não secretam metalo-proteases. A banda de 240 kDa observada em diversos isolados não foi completamente inibida em nenhum perfil dos isolados ou reisolados, mas nos isolados T4, T4r, AP4 e NEFF a atividade desta banda foi bastante reduzida pelo EDTA. O mesmo tendo ocorrido com a banda de 100 kDa do reisolado AP2r. A banda de 120 kDa foi mantida com a mesma atividade no isolado AP4 e reisolado AP4r e no NEFFr a banda teve a atividade bastante reduzida no gel com EDTA (Figura 17).

Quando utilizado o inibidor PMSF, as enzimas de qualquer que fosse o isolado ou reisolado foram completamente inibidas (Figura 20). Este resultado concorda com outros autores, que constataram a secreção majoritária de serino-proteases por *Acanthamoeba* (Figura 18 e Tabela 4).

A Tabela 6 apresenta um resumo das principais proteases secretadas pelos diferentes isolados, tanto da amostra na ausência de inibidores quanto na presença de EDTA e PMSF.

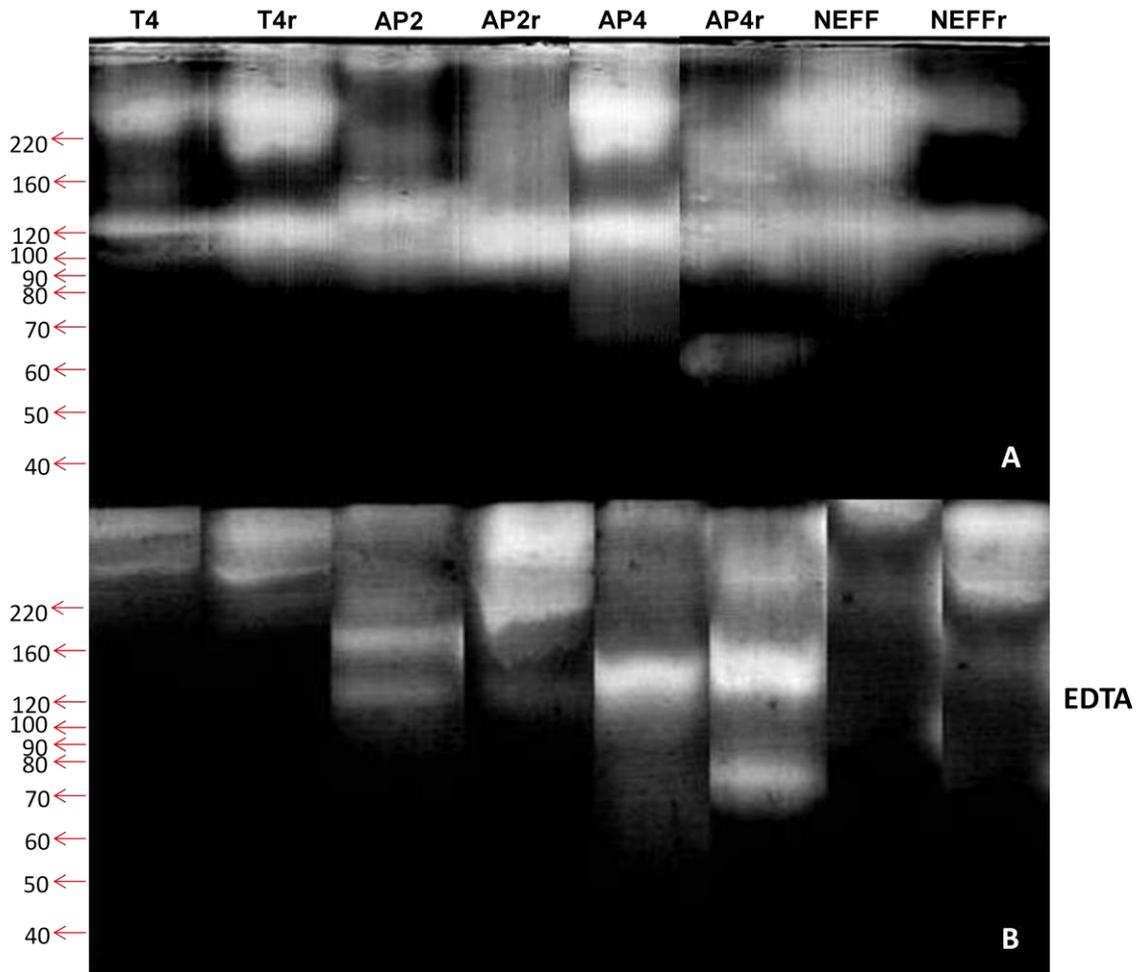


Figura 17. Perfil de atividade proteolítica em gel de zimograma contendo gelatina dos diferentes isoaldos de *Acanthamoeba* utilizados para infecção intra-nasal no modelo *in vivo*. A: sem incubação com EDTA. B: pré-incubados com EDTA. Peso molecular estimado das bandas indicado à esquerda (kDa).

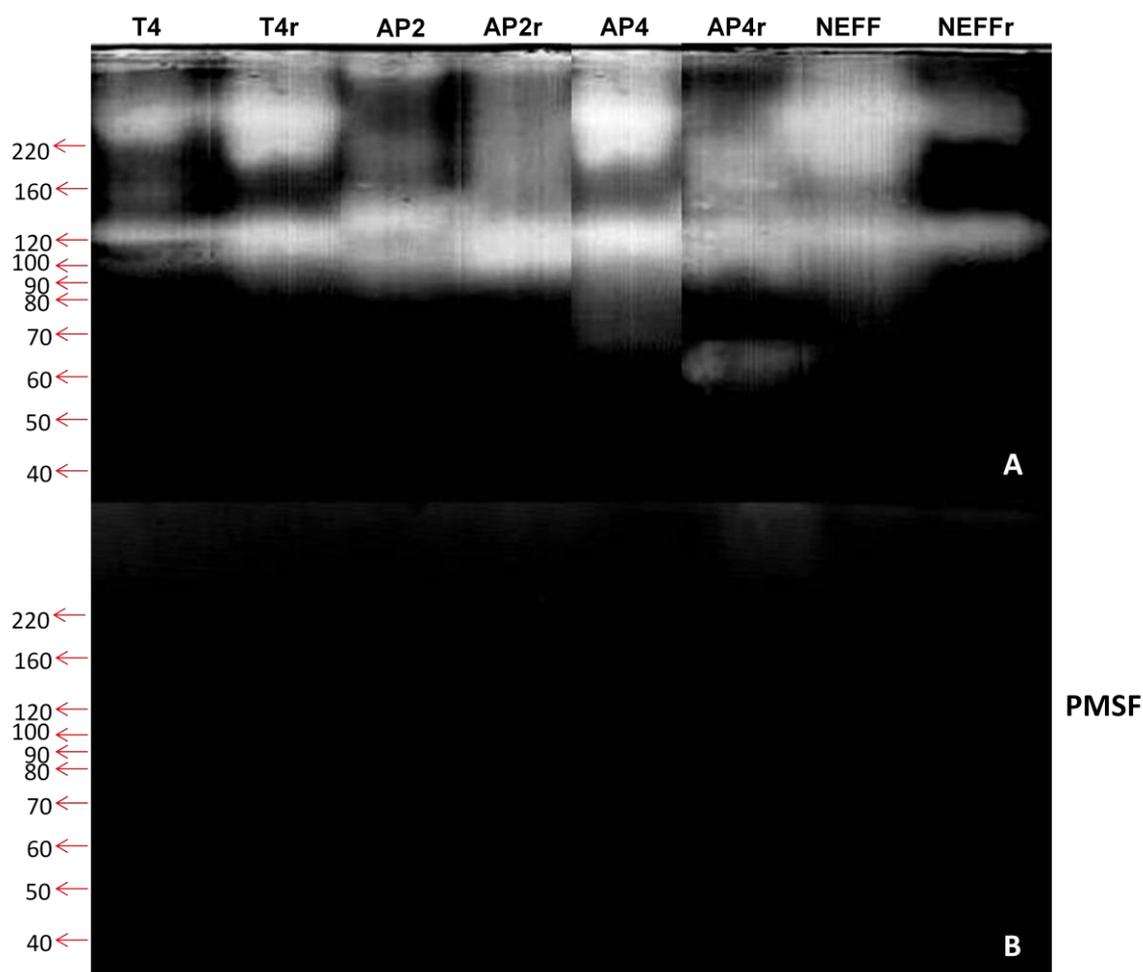


Figura 18. Perfil de atividade proteolítica em gel de zimograma contendo gelatina dos diferentes isoaldos de *Acanthamoeba* utilizados para infecção intra-nasal no modelo *in vivo*. A: sem incubação com PMSF e B: pré-incubados com PMSF. Peso molecular estimado das bandas indicado à esquerda (kDa).

Tabela 6. Perfil das principais proteases secretadas pelos isolados e reisolados de *Acanthamoeba* utilizados para infecção intra-nasal no modelo *in vivo*, conforme bandas presentes no gel de zimograma na ausência e na presença de inibidores de proteases específicos.

isolado	Amostras sem inibidores	Amostra + EDTA	Amostra + PMSF
T4	240, 140, 120	240*	-
T4r	240, 120	240*	-
AP2	180, 130, 100	180, 130, 100	-
AP2r	100	100*	-
AP4	240, 120	240*, 120	-
AP4r	180, 120, 65	180, 120, 65	-
NEFF	240, 120	240*	-
NEFFr	240, 120	240, 120*	-

*Indica que a banda está presente, porém com menor atividade. Os valores correspondem aos pesos moleculares estimados das bandas (kDa).

Sabe-se que diferentes cepas de *Acanthamoeba* produzem e secretam serino, metalo e cisteíno proteases (Pettit *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 1998; Alfieri *et al.*, 2000; Alsam *et al.*, 2005; Harrison *et al.*, 2010), de maneira que as proteases presentes nos MC dos isolados avaliados neste trabalho foram caracterizadas com inibidores específicos para serino e metalo-proteases, PMSF e EDTA, respectivamente.

O PMSF é um inibidor irreversível de serino proteases, pela fosforilação dos sítios ativos dos resíduos de serina. Este inibe também cisteíno proteases, porém esta inibição é reversível pelo tratamento com ditioneitol (DTT) (James, 1978). Já o EDTA é um quelante de cátions divalentes que inibe metalo-proteases que requerem esses cátions para sua atividade (Auld, 1995).

Metallo-proteases são enzimas que apresentam uma grande diversidade de sítios ativos, todos dependentes de íons metálicos divalentes para sua atividade. Essas enzimas estão amplamente distribuídas nos seres vivos (Barret; Rawlings; O'Brien, 1995). Os isolados estudados em nosso trabalho demonstraram secretar metallo-proteases com grande atividade em gel de zimograma (Figuras 15 e 17).

De maneira geral, o EDTA apresentou efeitos sobre diversas enzimas presentes nos perfis dos isolados avaliados. A presença de metallo-proteases tem sido relatada em diversos estudos, embora o papel destas enzimas na patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* ainda não esteja esclarecido. ALSAM *et al.* (2005) identificaram metallo-proteases em um isolado de *Acanthamoeba* do grupo T1, retirado de um paciente com EGA. Essa metallo-protease apresentou importante atividade relacionada ao aumento da permeabilidade de um modelo *in vitro* da barreira hemato-encefálica (BHE). Em outro estudo essa classe de protease foi relacionada à degradação de laminina, fibronectina e colágeno tipo I e IV (Rosenberg, 2002). Para SISSONS *et al.* (2006), a função de metallo-proteases está relacionada aos processos pós infecção, já que não demonstraram a capacidade de romper monocamadas celulares. Em nosso estudo, as enzimas presentes no MC não foram purificadas, o que torna possível que mais de uma protease seja responsável pela atividade observada numa só banda do gel. Isto pode explicar a inibição apenas parcial de algumas bandas pelo EDTA.

Na Tabela 4 estão reunidos dados de diversas proteases isoladas e caracterizadas em estudos anteriores com *Acanthamoeba*. Serino-proteases são

frequentemente isoladas de *Acanthamoeba* e tem sido extensivamente estudadas. KHAN (2003) sugere que essas enzimas têm um papel crucial no desencadeamento do processo da ceratite por *Acanthamoeba*, sendo apoiado por resultados de testes *in vitro* onde as enzimas na presença de PMSF não apresentam qualquer citotoxicidade.

Serino-proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de serina em seu sítio ativo. Estão presentes em vírus, procariotos e eucariotos, o que indica a importância dessa classe de enzima (Barret, 1995). Em *Acanthamoeba*, essas enzimas secretadas possuem funções relacionadas à degradação de diversas moléculas associadas a MEC (Tabela 4). Quando os MC testados no presente estudo foram incubados com PMSF para caracterizar as proteases no gel de zimograma todas as bandas foram inibidas, demonstrando a importância dessa classe de enzima para o protozoário. Muitas bandas de proteases foram inibidas tanto pelo EDTA quanto pelo PMSF. Enzimas com essa característica já foram relatadas em trabalhos que estudaram proteases de outros microrganismos, como *Bacillus* sp. (Tatineni *et al.*, 2008; Correa, 2009). É possível que estas enzimas possuam resíduos de serina no sítio ativo, exigindo íons metálicos para atividade ou para atingir estabilidade (Tatineni *et al.*, 2008).

Até o momento não se sabe qual o papel exato de serino-proteases na patogênese de *Acanthamoeba*, mas diversos estudos tem correlacionado seu papel ao aumento de permeabilidade da BHE (Alsam *et al.*, 2005), degradação de moléculas estruturais importantes para manutenção da integridade de tecidos, como colágeno (Mitro *et al.*, 1994; Sissons *et al.*, 2006), indução de apoptose (Chusattayanond *et al.*, 2010) e degradação de citocinas, quimiocinas, IgA e IgG auxiliando o protozoário na evasão do sistema imune do hospedeiro (Na *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006; Harrison *et al.*, 2010). Todas essas funções são determinantes para invasão e estabelecimento de infecção. O PMSF, como inibidor de serino-proteases, consegue reduzir de 75 a 100% os efeitos citopáticos dos isolados ou MC de *Acanthamoeba*, o que justifica a idéia do desenvolvimento de agentes terapêuticos à base deste inibidor (Na *et al.*, 2001; Alsam *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Sissons *et al.*, 2006).

Todos os isolados testados no presente estudo secretaram serino-proteases, entretanto não foi possível associar a quantidade de enzima secretada com a patogenicidade observada. Mesmo aqueles isolados que não se mostraram

patogênicos no teste *in vivo* pelo modelo de infecção ocular secretaram diversas serino-proteases (Figura 16), indicando que esta enzima pode exercer também funções não relacionadas à patogenicidade.

4.3.5. Atividade proteolítica dos isolados de Acanthamoeba utilizados no Modelo de Infecção Ocular e influência da temperatura e pH na atividade

A atividade proteolítica presente nos MC foi quantificada pela capacidade das proteases secretas pelos diferentes isolados de *Acanthamoeba* em hidrolizar azocaseína. Pelos resultados apresentados observa-se que a atividade é bastante variável entre os isolados testados, destacando-se o isolado NEFF com a maior atividade (24,4 U/mL) e o isolado PW-MH2 com a menor (5,67 U/mL), na temperatura ótima para a atividade proteolítica de cada isolado estudado (Tabela 7).

A Tabela 7 apresenta resultados que demonstram a grande influência da temperatura sobre a atividade enzimática dos isolados estudados, visto que quando comparados os valores, a atividade proteolítica a 37°C foi cerca de 50% menor que aquela obtida na temperatura ótima para atividade proteolítica dos isolados (Figura 19). Para a maioria dos isolados a melhor atividade proteolítica foi obtida a 60°C, com exceção dos isolados AP4, NEFF e LC30 para os quais a temperatura ótima foi de 50°C.

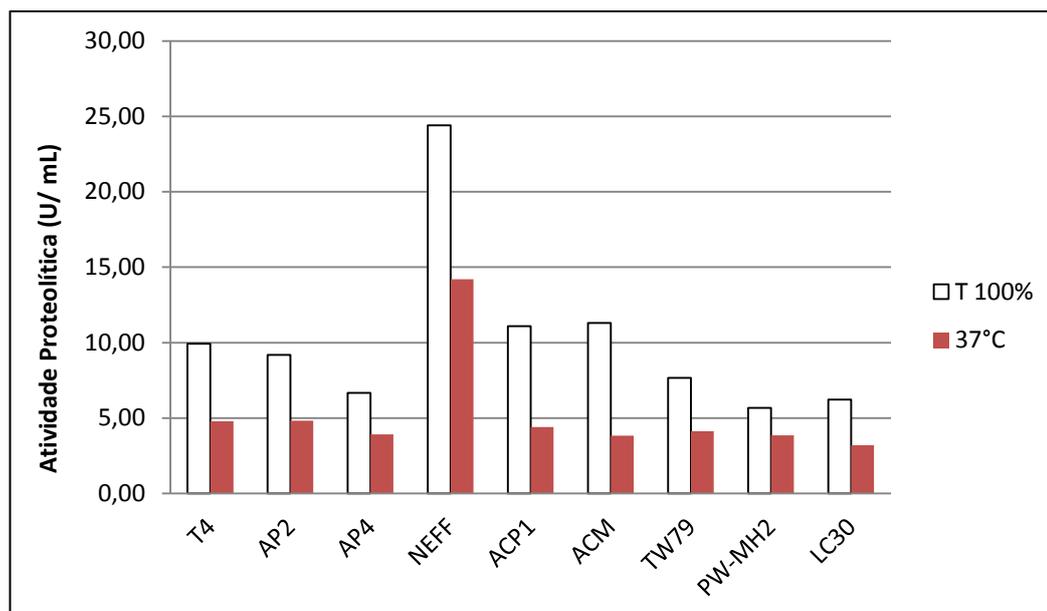


Figura 19. Comparação da atividade proteolítica nos meios condicionados dos isolados de *Acanthamoeba* estudados no modelo *in vivo* para infecção ocular em diferentes temperaturas. T 100%: temperatura ótima de atividade das proteases do MC; 37°C: Temperatura padrão de incubação do ensaio de azocaseína.

Tabela 7. Influência da Temperatura na Atividade Proteolítica dos Isolados de *Acanthamoeba* estudados no modelo *in vivo* para infecção ocular.

ISOLADOS	TEMPERATURAS (°C)									
	25	30	35	37	40	42	50	60	70	80
T4	2,56	3,38	3,84	4,79	4,64	4,65	9,51	9,93	4,07	3,07
AP2	3,19	2,34	3,14	4,84	4,09	4,92	7,55	9,18	6,71	4,21
AP4	2,70	1,42	2,86	3,91	3,24	4,99	6,67	6,22	6,11	3,76
NEFF	6,84	9,50	12,82	14,20	14,30	16,38	24,40	23,50	18,13	13,35
ACP1	2,80	1,85	3,30	4,41	4,02	4,69	8,55	11,10	8,78	4,67
ACM	2,47	1,86	2,50	3,83	2,76	4,13	4,11	11,30	7,27	2,00
TW79	3,11	3,48	3,50	4,14	3,48	5,49	5,89	7,67	6,40	3,78
PW-MH2	2,71	2,46	2,48	3,86	2,70	5,49	5,64	5,67	4,91	3,02
LC30	2,59	1,94	2,52	3,20	2,72	4,35	6,22	5,35	5,30	2,69

Atividade proteolítica expressa em Unidade de Atividade Proteolítica por mL (U/mL), resultado da média de três repetições.

A influência do pH na atividade das proteases secretadas pelos isolados de *Acanthamoeba* foi avaliada sempre na temperatura ótima para a atividade enzimática de cada MC (Figura 20). As enzimas se mostraram bastante estáveis com a variação do pH, embora tenham demonstrado clara preferência por pH de neutro a alcalino. O pH ótimo para atividade proteolítica variou entre 7,0, 8,0 e 9,0 o

pH ótimo para a atividade proteolítica das enzimas presentes nos MC dos diferentes isolados.

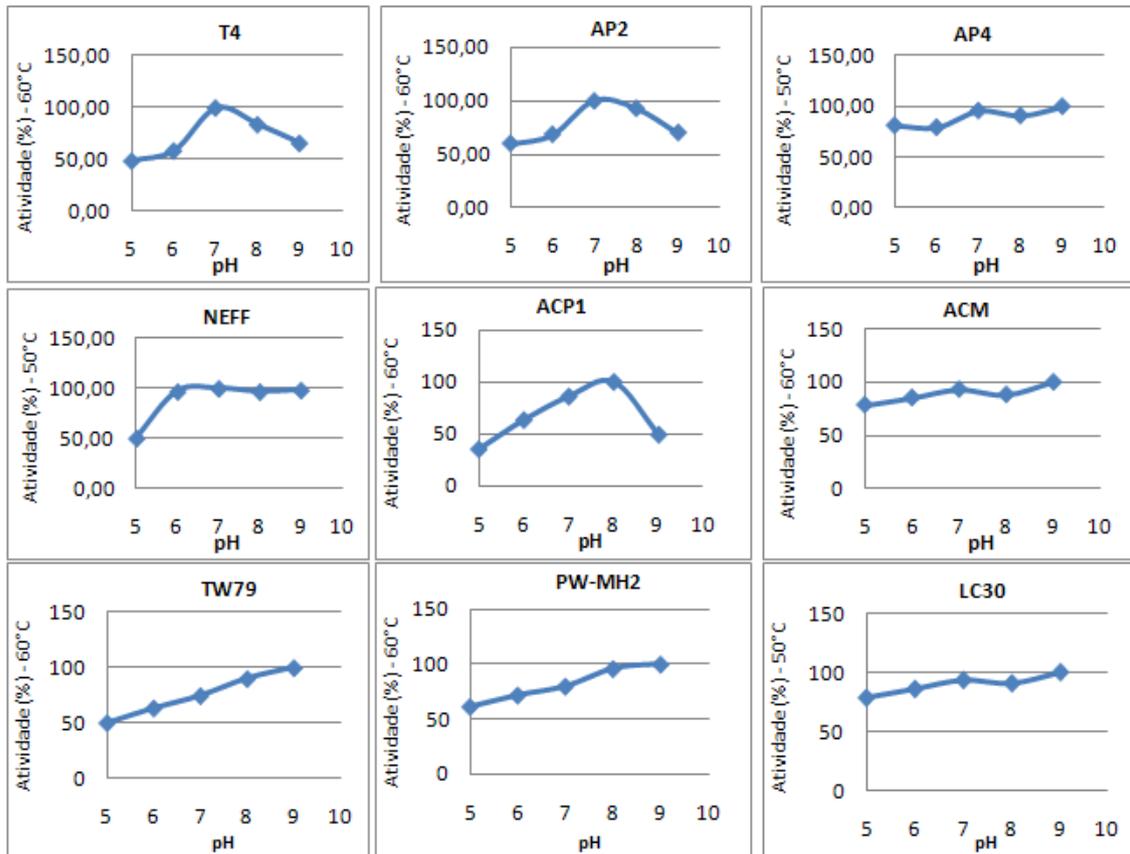


Figura 20. Influência do pH sobre a atividade proteolítica dos isolados de *Acanthamoeba* estudados no modelo *in vivo* para infecção ocular.

4.3.6. Atividade proteolítica dos isolados e reisolados de *Acanthamoeba* utilizados no Modelo de Infecção Intra-Nasal e influência da temperatura e pH na atividade

A atividade proteolítica foi determinada e comparada entre os isolados e reisolados de *Acanthamoeba* estudados. Todos os isolados apresentaram atividade frente à azocaseína. Na temperatura ótima para atividade proteolítica dos diferentes MC o isolado NEFF apresentou a maior atividade (24,40 U/mL), enquanto o NEFFr a menor (5,0 U/mL). Em geral não houve grande variação entre a atividade proteolítica dos isolados e reisolados, com exceção do isolado NEFF (24,40 U/mL) e o reisolado NEFFr (5,00 U/mL) (Figura 21).

É importante destacar que a temperatura possui muita influência sobre a atividade proteolítica das enzimas do MC, sendo observado que na temperatura ótima os isolados atingiram o dobro da atividade proteolítica do que a obtida a 37°C (Tabela 8). A temperatura ótima para atividade proteolítica das enzimas secretadas pelos isolados variou entre 50°C, 60°C e 70°C, dependendo do isolado, sendo que nem sempre foi a mesma para o respectivo reisolado, como no caso dos isolados e reisolados AP2 (60°C) e AP2r (70°C) e AP4 (50°C) e AP4r (70°) (Tabela 8).

Tabela 8. Influência da temperatura na atividade proteolítica dos isolados de *Acanthamoeba* utilizados para infecção intra-nasal no modelo *in vivo*

ISOLADOS	TEMPERATURAS (°C)									
	25	30	35	37	40	42	50	60	70	80
T4	2,56	3,38	3,84	4,79	4,64	4,65	9,51	9,93	4,07	3,07
T4r	2,88	2,06	2,86	4,74	3,94	4,68	6,93	7,60	7,27	4,56
AP2	3,19	2,34	3,14	4,84	4,09	4,92	7,55	9,18	6,71	4,21
AP2r	3,20	2,75	5,12	4,88	4,89	6,28	9,91	10,35	12,60	9,33
AP4	2,70	1,42	2,86	3,91	3,24	4,99	6,67	6,22	6,11	3,76
AP4r	3,61	4,36	4,02	6,29	5,38	7,13	10,20	8,44	11,27	9,78
NEFF	6,84	9,50	12,82	14,20	14,30	16,38	24,40	23,50	18,13	13,35
NEFFr	1,97	1,00	2,20	2,81	2,34	4,51	5,00	4,33	4,64	4,40

Atividade proteolítica expressa em Unidade de atividade proteolítica por mL (U/mL). Experimentos realizados em triplicata.

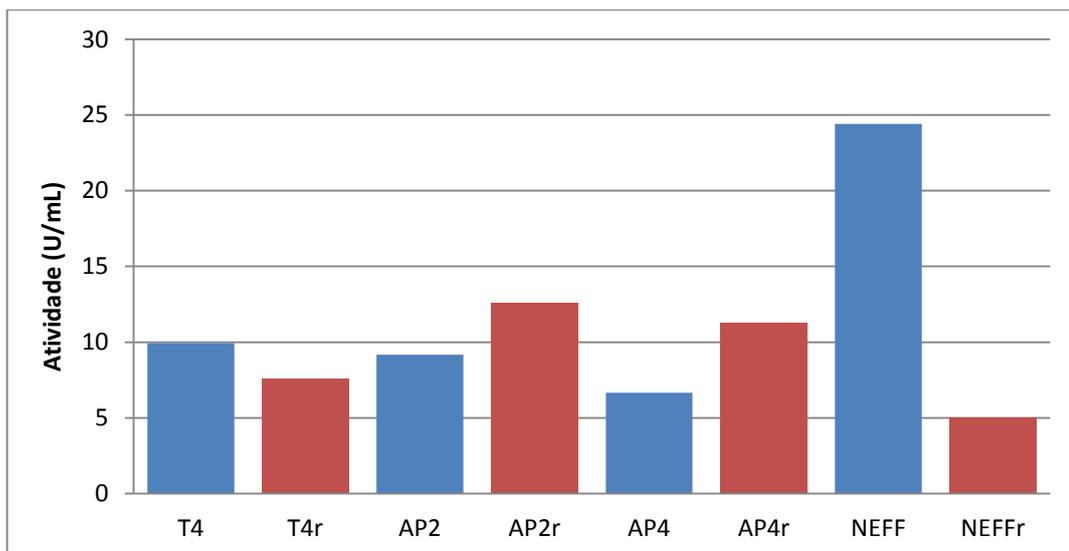


Figura 21. Atividade proteolítica dos isolados utilizados para infecção intra-nasal no modelo *in vivo*, antes e depois do reisolamento na temperatura ótima para atividade.

Em relação à influência do pH na atividade proteolítica dos isolados de *Acanthamoeba*, foi demonstrado que as enzimas dos isolados estudados nesse trabalho tem preferência por pHs neutros a alcalinos, 7.0, 8.0 ou 9.0. Considerando a curva do isolado e do reisolado, percebe-se que para alguns reisolados o pH ótimo para atividade proteolítica se altera em relação ao respectivo isolado, é o caso do isolado T4 (pH ótimo 7.0) e reisolado T4r (pH ótimo 9.0) e para o isolado AP2 (pH ótimo 7.0) e AP2r (pH ótimo 8.0) (Figura 22).

A variação da temperatura e pH ótimos entre isolados e reisolados pode ser justificada pela produção e secreção de diferentes proteases pelo reisolado (Tabela 6). Ainda sim, são necessários novos estudos *in vivo* utilizando essas proteases purificadas para estabelecer esta relação corretamente.

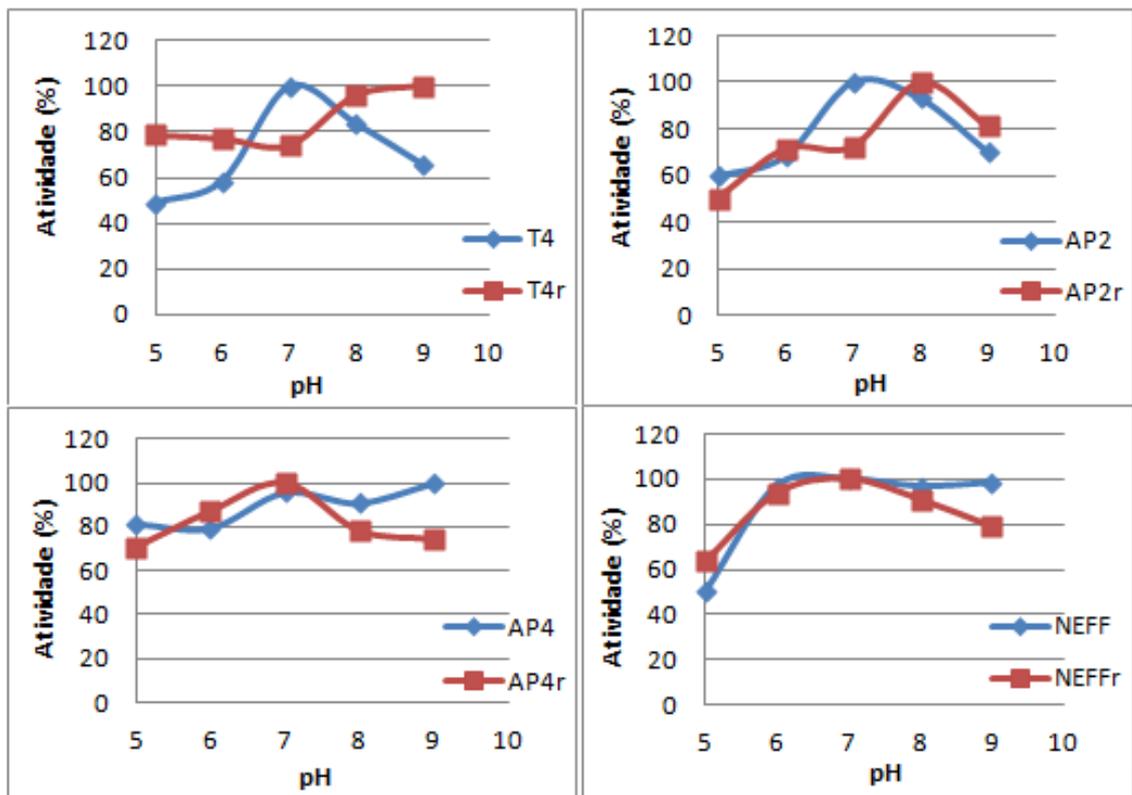


Figura 22. Influência do pH na atividade proteolítica dos isolados de *Acanthamoeba* utilizados para infecção intra-nasal no modelo *in vivo*.

Neste trabalho não procuramos purificar uma protease específica e sim demonstrar o perfil de proteases que cada isolado pode produzir e secretar, por isso ao estudarmos o MC de cada isolado avaliamos um número variável de proteases e

isoenzimas o que, em parte, pode explicar nossos resultados em relação ao comportamento da atividade enzimática com a variação da temperatura e pH, que demonstraram diversos picos de atividade.

De acordo com os dados da Tabela 4, podemos observar que as enzimas secretadas por *Acanthamoeba* são resistentes a temperaturas elevadas, sendo que a melhor temperatura para atividade proteolítica foi observada em torno de 55°C (Cho *et al.*, 2000; Na *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006; Sissons *et al.*, 2006), corroborando com nossos resultados (Tabelas 7 e 8). Em relação ao pH, as proteases dos isolados por nós analisados demonstraram preferência por pHs neutros ou alcalinos, característica comum aos isolados já estudados e citados na literatura.

Embora tanto para o ensaio da azocaseína quanto para os géis de zimograma as amostras tenham sido utilizadas na mesma concentração de proteínas totais, 0,5 mg/mL, não foi possível estabelecer uma relação entre os valores da atividade proteolítica e a atividade observada no gel de zimograma, quantidade e tamanho das bandas. A falta de relação entre esses resultados pode ser justificada principalmente pela utilização de diferentes substratos nos ensaios, pois enquanto a azocaseína foi utilizada para quantificação da atividade proteolítica total dos MC, gelatina era o substrato a ser degradado nos géis de zimograma, de maneira que as proteases no MC demonstraram afinidades distintas por diferentes substratos. Outros fatores que podem ter influenciado nas diferenças observadas incluem condições como pH dos tampões, temperatura e tempo de incubação nos diferentes ensaios.

Através dos ensaios utilizados, não foi evidenciada relação entre a atividade proteolítica, tanto em gel quanto em azocaseína, com a patogenicidade apresentada pelo isolado de *Acanthamoeba* por nenhum dos ensaios *in vivo* realizados neste trabalho. Por outro lado, LORENZO-MORALES *et al.* (2005) relacionou o nível de atividade proteolítica com o grau de citopatogenicidade, verificando esta relação nos seus resultados. Outro estudo demonstrou que o isolado ATCC 30461, considerado patogênico, possuía uma atividade proteolítica maior do que o isolado não patogênico, ATCC 30872 (Rocha-Azevedo & Silva-Filho, 2007). O presente trabalho também avaliou a atividade destes dois isolados concordando com os resultados do estudo anterior, entretanto essa atividade não teve influência sobre a patogenicidade pelo teste *in vivo* de infecção ocular, visto que nenhum destes isolados

estabeleceram infecção nos olhos. Por outro lado, no teste *in vivo* por inoculação intra nasal AP2 e AP4 demonstraram graus de patogenicidade distintos, avaliado pela disseminação da infecção nos animais.

KIM *et al* (2006) estudaram três isolados diferentes de *Acanthamoeba*, provenientes do solo, EGA e ceratite, demonstrando diferentes graus para atividade proteolítica dos isolados, diretamente relacionados ao efeito citopático observado, ou seja, o isolado clínico apresentou maior atividade do que o isolado ambiental. Em nosso trabalho não foi observada associação entre o modelo *in vivo* de infecção ocular e a quantificação da atividade proteolítica, já que os isolados PW-MH2 e TW79 estão entre os que apresentaram menor atividade. Tampouco foi possível associar a origem ou genótipo do isolado com a atividade das proteases (Tabela 7).

Conforme os dados sugerem, um grupo de proteases ou apenas uma protease não é capaz de definir por si só a patogenicidade de *Acanthamoeba*, embora possam estar intimamente associadas a atividades que auxiliem na adesão, invasão, evasão do sistema imune e estabelecimento da infecção, fato que ajuda a entender as mudanças nos perfis proteolíticos, entre isolados e reisolados.

4.4. Caracterização *in vitro* da patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba*

A termotolerância é característica fenotípica de algumas amebas de vida livre (AVL), conferindo a elas a capacidade de permanecerem viáveis nos hospedeiros (Odom *et al.*, 1997; Schuster & Visvesvara, 2004). O teste de termotolerância tem por objetivo avaliar a capacidade de crescimento de *Acanthamoeba* em diferentes temperaturas. O crescimento à temperatura de 37°C demonstra a capacidade que a ameba teria de sobreviver à temperatura corporal humana. Já o crescimento a 42°C pode determinar o potencial patogênico de *Acanthamoeba*, pois está relacionada à temperatura do estado febril humano (Walochnik *et al*, 2000a; Khan *et al*, 2001).

Para substituir testes com cultivo celular, foi estabelecido o ensaio de osmotolerância, no qual somente isolados com capacidade de sobreviver em alta osmolaridade são considerados potencialmente patogênicos (Khan *et al.*, 2001).

Nesse trabalho a avaliação da termo e osmotolerância foi utilizada, pois são determinantes fisiológicos que podem ser usados na diferenciação e prévia

caracterização de isolados patogênicos e não patogênicos, principalmente quando correlacionados a outros testes (Khan, 2006).

4.4.1. Caracterização fisiológica dos isolados de Acanthamoeba utilizados no Modelo de Infecção Ocular

A termotolerância foi testada pela incubação dos isolados nas temperaturas de 30°C, 37°C e 42°C. Todos os isolados foram capazes de se desenvolver a 30°C e, com exceção dos isolados ACP1 e ACM, todos os isolados também foram capazes de crescer a 37°C, enquanto na temperatura de 42°C somente os isolados T4 e PW-MH2 conseguiram se desenvolver (Tabela 9).

Os resultados obtidos, associados aos dados de termo e osmotolerância, indicaram que a maioria dos isolados não apresentam potencial patogênico. As exceções se resumem aos isolados, AP2 e PW-MH2, classificados como isolados de baixo potencial patogênico e o isolado T4, avaliado como potencialmente patogênico (Tabela 9).

Feita a comparação entre a termo e osmotolerância e os resultados do teste *in vivo* de infecção ocular, os dados mostraram bastante concordância para a maioria dos isolados estudados, visto que grande parte deles não foram capazes de estabelecer infecção ocular pelo modelo testado e que, no caso do PW-MH2, a caracterização fisiológica apontou para o potencial patogênico do isolado. No caso dos isolados T4 e TW79, de fato não houve correlação entre os resultados dos experimentos, já que embora os dados do teste *in vitro* tenham indicado um potencial patogênico para o T4 este não estabeleceu infecção ocular nos animais e o inverso ocorreu com o isolado TW79, que inicialmente não apresentou indícios de patogenicidade, mas estabeleceu infecção nos olhos dos animais determinando sua patogenicidade.

Tabela 9. Termotolerância e Osmotolerância dos isolados de *Acanthamoeba* estudados no modelo *in vivo* para infecção ocular.

Isolados	37°C	42°C	0,5 M	1,0 M	Patogenicidade
T4*	+	+	+	+	Potencialmente Patogênico
AP2	+	-	+	+	Baixo Potencial Patogênico
AP4	++	-	++	-	Não Patogênico
NEFF*	+++	-	++	-	Não Patogênico
ACP1*	-	-	++	-	Não Patogênico
ACM*	-	-	-	-	Não Patogênico
TW79*	+	-	+	-	Não Patogênico
PT-MH2*	+++	++	+++	-	Baixo Potencial Patogênico
LC30*	+	-	+	-	Não Patogênico

Contagem de cistos e trofozoítos nos campos: (-): < 3; (+): de 3-10; (++): de 10 – 20; (+++): >20. (*) Fonte: Pens, 2008; Caumo *et al.*, 2009; Winck, 2011.

Os isolados que causaram infecção no modelo *in vivo* de infecção ocular foram reisolados das lesões e então utilizados em novos testes com o objetivo de avaliar mudanças fisiológicas em decorrência do contato e sobrevivência nos olhos dos animais. Em relação a isso, a Tabela 10 apresenta os dados de termo e osmotolerância para os isolados e reisolados PW-MH2 e TW79. Algumas importantes mudanças foram observadas após passagem pelo modelo animal dos reisolados TW79r e PW-MH2r. Essas amebas passaram a tolerar melhor ambientes com osmolaridade aumentada, contudo, o reisolado PW-MH2r não foi mais capaz de crescer a 42°C, característica observada no isolado antes da primeira infecção. Assim, o reisolado passou a ser classificado como não patogênico de acordo com as novas características. O mecanismo de adaptação a altas temperaturas e osmolaridade mantendo sua atividade metabólica ainda é desconhecido em *Acanthamoeba* (Khan *et al.*, 2001; Khan, 2006).

Tabela 10. Comparação entre termotolerância e osmotolerância de *Acanthamoeba* estudadas no modelo *in vivo* para infecção ocular, antes e depois do reisolamento

Isolados	37°C	42°C	0,5 M	1,0 M	Patogenicidade
TW79*	+	-	+	-	Não Patogênico
TW79r	+	-	+	+	Não Patogênico
PW-MH2*	+++	++	+++	-	Baixo Potencial Patogênico
PW-MH2r	++	-	+	+	Não Patogênico.

Contagem de cistos e trofozoítos nos campos: (-): < 3; (+): de 3-10; (++): de 10 – 20; (+++): >20. (*) Fonte: Caumo *et al.*, 2009; Winck, 2011.

4.4.2. Caracterização fisiológica dos isolados de *Acanthamoeba* utilizados no Modelo de Infecção Intra-Nasal

Os resultados apresentados na Tabela 11 demonstram a classificação dos isolados em relação à patogenicidade, dadas as características fisiológicas de termo e osmotolerância estudadas para cada isolado. Os isolados T4 e AP2 se destacaram por terem apresentado melhor capacidade de termotolerância e osmotolerância, respectivamente. Todos os demais isolados e reisolados estudados, incluindo os reisolados T4r e AP2r, seriam classificados como não-patogênicos pelas características de crescimento apresentadas.

A avaliação através de testes fisiológicos, juntamente com os resultados obtidos pelo teste *in vivo* de infecção por inoculação intra-nasal não indica que as características verificadas nos testes estejam relacionadas, já que todos os isolados causaram infecção *in vivo*.

Tabela 11. Termotolerância e Osmotolerância dos isolados de *Acanthamoeba* utilizados para infecção intranasal no modelo *in vivo*, antes e depois de reisolados.

isolados	37°C	42°C	0,5 M	1,0 M	Patogenicidade
T4*	+	+	+	+	Potencialmente Patogênico
T4r	++	-	++	-	Não Patogênico
AP2	+	-	+	+	Baixo Potencial Patogênico
AP2r	+	-	+	-	Não Patogênico
AP4	++	-	++	-	Não patogênico
AP4r	++	-	+++	-	Não Patogênico
NEFF*	+++	-	++	-	Não Patogênico
NEFFr	+	-	++	-	Não Patogênico

Contagem de cistos e trofozoítos nos campos: (-): < 3; (+): de 3-10; (++): de 10 – 20; (+++): >20. (*) Dados do grupo de pesquisa em parasitologia – UFRGS.

É de extrema importância a avaliação do potencial patogênico de novos isolados ambientais. Fatores fisiológicos e bioquímicos da patogenicidade de *Acanthamoeba* incluem termotolerância, osmotolerância e secreção de proteases (Khan *et al.*, 2001; Clarke & Niederkorn, 2006). Somado a isso, KHAN (2001) e KHAN *et al.* (2002) defendem que termo e osmotolerância também são bons indicadores da virulência dos isolados, de modo que procuramos relacionar estes dados com aqueles dos estudos *in vivo*. Nesse sentido concluímos que, para os isolados estudados, foi difícil estabelecer uma relação direta entre os resultados dos

testes de osmo e termotolerância e patogenicidade *in vivo*, especialmente pelos resultados obtidos com o modelo de infecção intra-nasal.

Apesar de muitos testes serem utilizados no sentido de prever a patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba*, o teste *in vivo* é considerado padrão-ouro para essa determinação, fato que torna imprescindível a correlação dos dados de termo e osmotolerância com os resultados dos testes *in vivo* para poder determinar a importância destes dados.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho avaliou os perfis de atividade proteolítica de MC de *Acanthamoeba* isolada de casos clínicos e do ambiente em gel de zimograma com o objetivo de caracterizar as proteases secretadas e relacioná-las com a capacidade patogênica apresentada pelo isolado, nos testes *in vivo* e *in vitro*. Evidenciamos que os isolados estudados secretam quantidades e tipos de proteases diferentes entre si, embora alguns isolados tenham apresentado perfis de proteases idênticos no zimograma. O perfil de proteases secretadas não pode ser associado a genótipos ou espécies e nem à patogenicidade *in vivo* dos diferentes isolados.

O modelo *in vivo* de infecção ocular demonstrou que isolados ambientais podem estabelecer infecções oculares e as cepas ambientais ATCC 30010 (NEFF) e 39872 (AP4) causam infecções sistêmicas disseminadas em ratos. Em conjunto, os dois modelos *in vivo* estudados reforçam a necessidade da caracterização de isolados ambientais de *Acanthamoeba* no sentido de que epidemiologicamente é imprescindível o estabelecimento de áreas de risco para indivíduos suscetíveis às infecções, como usuários de lentes de contato, pessoas com a córnea lesionada e indivíduos imunossuprimidos. Os modelos *in vivo* utilizados foram bastante eficientes para estabelecer infecção e diferenciar isolados em relação ao grau de virulência. O fato dos isolados ATCC causarem infecção somente pelo método de inoculação intra-nasal nos mostrou que a via de infecção e o estado imunológico do hospedeiro são fatores que influenciam de maneira decisiva na patogenicidade de *Acanthamoeba*. Nosso estudo também demonstrou que amebas mantidas por muito tempo no laboratório são menos virulentas que aquelas recentemente isoladas, indicando a necessidade de passar isolados mantidos em laboratório por um modelo animal antes de realizar experimentos que visem estudar expressão de genes e outros metabólitos que possam influenciar na virulência deste protozoário.

Os dados dos estudos *in vitro* em relação aos resultados dos estudos *in vivo* demonstraram que apesar de muito úteis, testes genotípicos e fenotípicos para verificar diferenças entre essas cepas, como termo e osmotolerância, perfis proteolíticos e mesmo efeito citopático *in vitro*, até o momento não podem prever individualmente a patogenicidade dos isolados, sendo necessários testes *in vivo* para verificar a virulência dos mesmos.

Embora o perfil de proteases secretadas não tenha demonstrado influência direta sobre a virulência dos isolados estudados, é evidente que elas possuem um papel fundamental na patogênese deste protozoário. Além disso, o estudo destas proteases pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

Este trabalho fornece diversas perspectivas de estudos que podem auxiliar no entendimento futuro das diferenças de patogenicidade entre isolados de *Acanthamoeba*. Entre elas, pode-se citar: estudos utilizando as proteases purificadas; géis com substratos variados; e produção de MC em meios de cultivo com substratos específicos, como manose, por exemplo. A associação dessas estratégias com modelos *in vivo* pode comprovar a influência destes fatores na patogenicidade. Modelos *in vivo* se mostram úteis também para aplicação em levantamentos epidemiológicos com classificação de áreas de risco, bem como manutenção de características patogênicas de cepas mantidas em laboratório.

6. BIBLIOGRAFIA

ALFIERI, S.C.; CORREIA, C.E.B.; MOTEGI, S.A.; PRAL, E.M.F. Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 220-227, 2000.

ALIZADEH, H.; HE, Y.; McCULLEY, J.P.; MA, D.; STEWART, G.L.; VIA, M. et al. Successful immunization against *Acanthamoeba* keratitis in a pig model. **Cornea**, v. 14, p. 180-6, 1995.

ALIZADEH, H., NEELAM, S., NIEDERKORN, J. Y. Effect of Immunization with the Mannose-Induced *Acanthamoeba* Protein and *Acanthamoeba* Plasminogen Activator in Mitigating *Acanthamoeba* Keratitis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 48, p. 5597-5604, 2007.

ALSAM, S.; KIM, K.S.; STINS, M.; RIVAS, A.O.; SISSONS, J.; KHAN, N.A. *Acanthamoeba* interaction with human brain microvascular endothelial cells. **Microb Pathog.**, v. 35, p. 235–241, 2004.

ALSAM, S.; SISSONS, J.; JAYASEKERA, S.; KHAN, N.A. Extracellular proteases of *Acanthamoeba castellanii* (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increased permeability an in vitro model of the human blood-brain barrier. **Journal of infection**. v. 51, p. 150-156, 2005.

AULD, D.S. A remoção e substituição de íons metálicos em metalopeptidases. **Methods Enzymol.** v. 248, p. 228-242, 1995.

AURAN, J.D.; STAR, M.B.; JAKOBIEC, F.A.; *Acanthamoeba* keratitis. A review of the literature. **Córnea**, New York, v. 6, p. 2-26, 1987.

ALVARENGA, L.S.; FREITAS, D.; HOFLING-LIMA, A.L. Ceratite por *Acanthamoeba*. Atualização continuada 2001. Disponível em: <http://www.abonet.com.br/abo/atcont12.htm>

ALVORD, L.; COURT, J.; DAVIS, T.; MORGAN, C.F.; SCHINDHELM, K.; VOGT, J.; WINTERTON, L. Oxygen permeability of a new type of high risk soft contact lens material. **Optom Vis Sci**, v. 75, p. 30–36, 1998.

AWWAD, S.T.; PETROLL, W.M.; McCULLEY, J.P.; CAVANAGH, H.D. Updates in *Acanthamoeba* keratitis. **Eye Contact Lens**, v. 33, p. 1–8, 2007.

BADENOCH, P.R.; JOHNSON, A.M.; CHRISTY, P.E.; COSTER, D.J. Pathogenicity of *Acanthamoeba* and a *Corynebacterium* in rat cornea. **Arch Ophthalmol**, v. 108, p. 107–112, 1990.

BARRET, A.J. Proteolytic Enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 244, p. 1-15, 1994.

BARRET, A.J. Proteolytic Enzymes: Aspartic and metallopeptidases. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 248, p. 183, 1995.

BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D.; O'BRIEN, E.A. The MEROPS database as a proteases information system. **Journal of structural by biology**. San Diego, v. 134, p. 95 – 102, 2001.

BEATTIE, T.K.; SEAL, D.V.; TOMLINSON, A.; McFADYEN, A.K.; GRIMASON, A.M. Determination of amoebicidal activities of multipurpose contact lens solutions by using a most probable number enumeration technique. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 2992-3000, 2003.

BOOTON, G.C.; VISVESVARA, G.S.; BYERS, T.J.; KELLY, D.J.; FUERST, P.A. Identification and Distribution of *Acanthamoeba* Species Genotypes Associated with Nonkeratitis. **Infections Journal of Clinical Microbiology**. Parkville, v. 43 (4), p. 1689–1693, 2005.

BORBA, Clintia de Maraes. Análise morfológica, bioquímica e molecular de cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* exibindo diferenças na patogenicidade. Doutorado, (Biologia Parasitária) – FIOCRUZ, 2002.

BOWERS, B.; KORN, E.D. The Fine Structure of *Acanthamoeba Castellanii* The Trophozoite. **The Journal of Cell Biology**. New York, v. 39, p. 95-111, 1968.

CABRAL, G.A. & MARCIANO-CABRAL, F. Cannabinoid-mediated exacerbation of brain infection by opportunistic amebae. **Journal of neuroimmunology**. v. 147, p. 127-130.

CAO, Z.; JEFFERSON, D.M.; PANJWANI, N. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. **J. Biol Chem**, v. 273, p. 15838-15845, 1998.

CAPILLA, J.; MAFFEI, C.M.; CLEMONS, K.V. Experimental systemic infection with *Cryptococcus neoformans* var. and *Cryptococcus gatti* in normal and immunodeficient mice. **Medical Mycology**, v. 44(7), p. 601-610, 2006.

CARLESSO, A. M.; ARTUSO, G. L.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. Potentially Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated from a Hospital in Brazil. **Curr Microbiol**. New York, v. 60, p. 185–190, 2010.

CARVALHO, F.R.; FORONDA, A.S.; MANNIS, M.J.; HOFLING-LIMA, A.L.; BELFORT, R.Jr.; DE FREITAS, D. Twenty years of *Acanthamoeba* Keratitis. **Cornea**, v. 28, 516–519, 2009.

CAUMO, K.; FRASSON, A.P.; PENS, C.J.; PANATIERI, L.F.; RAZZON, A.P.G.; ROTT, M.B. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. Liverpool, v. 103 (6), p. 477–485, 2009.

CAUMO, K.; ROTT, M.B. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 117 (3), p. 233-235, 2011.

CERVA, L. Intranasal, intrapulmonary and intracardial inoculation of experimental animals with *Hartmannella castellanii*. **Folia Parasitologica**, v. 14, p. 207–215, 1967.

CHO, J.H.; NA, B.K.; KIM, T.S.; SONG, C.Y. Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. **IUBMB Life**, v. 50, p. 209-214, 2000.

CHOMICZ, L.; ZEBROWSKA, J.; PIEKARCZYK, J.; STAROECIAK, B.; MYJAK, P.; WALSKI, M.; KAZIMIERCZUK, Z. In vitro studies on susceptibility of *Acanthamoeba castellanii* to selected chemical agents. **Acta Parasitologica**, Warsaw, v. 50, p. 25–31, 2005

CHUSATTAYANOND, A.D.; BOONSILP, S.; KASISIT, J.; BOONMEE, A.; WARIF, S. That *Acanthamoeba* isolate (T4) induced apoptotic death in neuroblastoma cells via the bax-mediated pathway. **Parasitology International**, v. 59, p. 512-516, 2010.

CLARKE, D.W.; NIEDERKORN, J.Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis, **Trends in Parasitology**, v. 22(4), 2006.

CORREA, Ana Paula Folmer. **Purificação parcial e caracterização de uma protease alcalina queratinolítica de *Bacillus* sp. P7¹**. Dissertação de Mestrado (Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

CORSARO, D.; VENDITTI, D. Detection of Chlamydiae from freshwater environments by PCR, amoeba coculture and mixed coculture. **Res Microbiol**, v. 160, p. 547–552, 2009.

CORSARO, D.; VENDITTI, D. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa. Acanthamoebida). **Parasitology Research**. Berlin, v. 107, p. 233–238, 2010.

CULBERTSON, C.G.; SMITH, J.W.; COHEN, H.K.; MINNER, J.R. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. **American Journal of Pathology**, v. 35, p. 185-197, 1959.

DART, J.K.G.; STAPLETON, F.; MINASSIAN, D. Contact lenses and other risk factors in microbial keratitis. **Lancet**, v. 338, p. 650–653, 1991.

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

DE SOUZA CARVALHO, F.R.; CARRIJO-CARVALHO, L.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; FORONDA, A.S.; FREITAS, D. Serine-like proteolytic enzymes correlated with differential pathogenicity in patients with acute *Acanthamoeba* keratitis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17(4), p. 1603-9, 2011.

DUARTE, Juliana Lúcia. **Caracterização morfológica, molecular e fisiológica de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba***. Paraná, 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Departamento de Patologia Básica. Universidade Federal do Paraná.

FERREIRA, G. A.; MAGLIANO, A. C. M.; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C. Elastase secretion in *Acanthamoeba polyphaga*. **Acta Tropica**. v. 112, p. 156–163, 2009.

FICKER L.A.; KIRKNESS, C.; WRIGHT, P.; Prognosis for keratoplasty in *Acanthamoeba* keratitis. **Ophthalmology, Rochester**, v. 100, p. 105-110, 1993

GALVÁN-MOROYOQUI, J.M.; DOMINGUEZ-ROBLES, M.C.; FRANCO, E.; MEZA, I. The Interplay between Entamoeba and Enteropathogenic Bacteria Modulates Epithelial Cell Damage. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2(7), p. 266, 2008.

GLADSON, C.L. The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function. **J. Neuropathol Exp Neural**, v. 58, p. 1029-1040, 1999.

GÓRNIK, K.; KÚZNA-GRYGIEL, W. Histological studies of selected organs of mice experimentally infected with *Acanthamoeba* spp. **Folia Morphol (Warsz)**, v. 64 (3), p. 161-7, 2005.

HADÁS, E.; MAZUR, T. Biochemical markers of pathogenicity and Virulence of *Acanthamoeba* sp. strains. **Parasitology Research**, v. 79, p. 696-698, 1993.

HARRISON, J.L.; FERREIRA, G.A.; RABORN, E.S.; LAFRENAYE, A.D.; MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G.A. *Acanthamoeba culbertsoni* elicits soluble factors that exert anti-microglial cell activity. **Infection and Immunity**, v. 78(9), p. 4001-4011, 2010.

HIDALGO-GRASS, C.; MISHALIAN, I; DAN-GOOR, M.; BELOTSEKOVSKY, I.; ERAN, Y.; NIZET, V.; PELED, A.; HANSKI, E. A streptococcal protease that degrades CXC chemokines and impairs bacterial clearance from infected tissues. **EMBO J.** v. 25, p. 4628-4637, 2006.

HURT, M.; NEELAM, S.; NIEDERKORN, J.Y.; ALIZADEH, H. Pathogenic *Acanthamoeba* spp. secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. **Infect Immun**, v. 71, p. 6243–6255, 2003.

IM, K.; KIM, D.S. Acanthamoebiasis in Korea: two new cases with clinical cases review. **Yonsei Med J**, v. 39, p. 478-484, 1998.

JAMES, G.T. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethyldulfonyl fluoride in buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 86 (2), p. 574. 1978

JEONG, H.J.; LEE, S.J.; KIM, J.H.; XUAN, Y.H.; LEE, K.H.; PARK, S.K.; CHOI, S.H.; CHUNG, D.I.; KONG, H.H.; OCK, M.S.; YU, H.S. *Acanthamoeba*: keratopathogenicity of isolates from domestic tap water in Korea. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 117 (4), p. 357-367, 2007.

JONES, B.R.; VISVESVARA, G.S.; ROBINSON, N.M. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. **Trans. Ophthalmol.** London, v. 95, p. 221–232, 1975.

JOHNS, K.J.; O'DAY, D.M.; FEMAN, S.S. Chorioretinitis in the contralateral eye of a patient with *Acanthamoeba* keratitis. **Ophthalmology**, v. 95, p. 635–639, 1988.

KHAN, N.A.; JARROL, E.L.; PONJVANI, N.J.; CAO, Z.; PAGET, T.A. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and non-pathogenic species of

Acanthamoeba. **Journal on Clinical Microbiology**. Washington, v. 38(8), p. 2858-2861, 2000.

KHAN, N.A. Pathogenicity, morphology and differentiation of *Acanthamoeba*. **Curr Microbiol**, v. 43, p. 391–395, 2001.

KHAN, N.A.; JARROLL, E.L.; PAGET, T.A. *Acanthamoeba* can be differentiated clinically by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Curr Microbiol**. New York, v. 43, p. 204–208, 2001.

KHAN, N.A.; JARROLL, E.L.; PAGET, T.A. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and non-pathogenic *Acanthamoeba*. **Current Microbiology**. New York, v. 45, p. 197-202, 2002.

KHAN, N.A. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 34, p. 277–285, 2003.

KHAN, N.A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. Federation of European Microbiological Societies. **Microbiological Review**. v. 30, p. 564-595, 2006.

KHAN, N.A. *Acanthamoeba* and the blood brain barrier: the breakthrough. **J. Med. Microbiol**, v. 57, p. 1051-7, 2008.

KHAN, N.A.; SIDDIQUI, R. *Acanthamoeba* affects the integrity of human brain microvascular endothelial cells and degrades the tight junction proteins. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 1611–1616, 2009.

KHAN, N.A. Novel *in vitro* and *in vivo* models to study central nervous system infections due to *Acanthamoeba* spp. **Experimental Parasitology**, v. 126, p. 69-72, 2010.

KIM, H-K.; HA, Y-R.; YU, S-H.; KONG, H-H; CHUNG, D. Purification and characterization of a 33 kDa serine protease from *Acanthamoeba lugdunensis* KA/E2 isolated from a Korean keratitis patient. **The Korean Journal of Parasitology**, v.41 (4), p. 89-196, 2003.

KIM, W.T.; KONG, H.H.; HA, Y.R.; HONG, Y.C., JEONG, H.J.; YU, H.S.; CHUNG, D.I. Comparison of specific activity and cytopathic effects of purified 33 kDa serine proteinase from *Acanthamoeba* strains with different degree of virulence. **Korean Journal of Parasitology**, v. 44(4), p. 321-330, 2006.

KONG, H.H.; SEO, S.A.; SHIN, C.O.; IM, K.I. The effect of active immunization with *Acanthamoeba culbertsoni* in mice born to immune mother. **Korean Journal of Parasitology**, v. 31, p. 157-163, 1993.

KOTTING, J.; BERGER, M.R.; UNGER, C.; EIBL, H. Alkylphosphocholines: influence of structural variations on biodistribution of antineoplastically active concentrations. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 30, p. 105–112, 1992.

LAM, D.S.C.; HOUANG, E.; FAN, S.P.; LYON, D.; SEAL, D.; WONG, E. Incidence and risk factors for microbial keratitis in Hong Kong: comparison with Europe and North America. **Eye**, v. 16, p. 608–618, 2002.

LEDEE, D.R.; LOVIENO, A.; MILLER, D.; MANDAL, N.; DIAZ, M.; FELL, J.; FINI, M.E.; ALFONSO, E.C. Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 1458-1462, 2009.

LEITSCH, D.; KÖHSLER, M.; MARCHETTI-DESCHMANN, M.; DEUTSCH, A.; ALLMAIER, G.; DUCHÊNE, M.; WALOCHNIK, J. A major role for cysteine proteases during the early phase of *Acanthamoeba castellanii* encystment. *Downloaded from ec.asm.org by* on March 25, 2010.

LINDQUIST, T.D. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea**, v. 17, p. 11–16, 1998.

LORENZO-MORALES, J. ORTEGA-RIVAS, A.; FORONDA, P.; ABREU-ACOSTA, N.; BALLART, D.; MARTINEZ, E.; VALLADARES, B. RNA interference (RNAi) for the silencing of extracellular serine proteases genes in *Acanthamoeba*: Molecular analysis and effect on patogenicity. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 144, p. 10-15, 2005.

LORENZO-MORALES, J.; MARTÍN-NAVARRO, C.M.; LÓPEZ-ARENCEBIA, A.; SANTANA-MORALES, M.A.; AFONSO-LEHMANN, R.N.; MACIVER, S.K.; VALLADARES, B.; MARTÍNEZ-CARRETERO, E. Therapeutic potencial of a combination of two gene-specific small interfering RNAs against clinical strains of *Acanthamoeba*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54(12), p. 5151-5155, 2010.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, v. 193(1), p. 265-77, 1951.

MAGHSOOD, A.H.; SISSONS, J.; REZAIAN, M.; NOLDER, D.; WARHURST, D.; KHAN, N.A. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**. Edinburgh, v. 54, p. 755–759, 2005.

MAGLIANO, A.C.M.; SILVA, F.M.; TEIXEIRA, M.M.G., ALFIERI, S.C. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. **Experimental Parasitology**. Orlando, v. 123, p. 231–235, 2009.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 16 (2), p. 273–307, 2003.

MARKOWITZ, S.M.; SOBIESKI, T.; MARTINEZ, A.J.; DUMA, R.J. Experimental *Acanthamoeba* infections in mice pretreated with methylprednisolone or tetracycline. **Am J Pathol**, v. 92, p. 733-43, 1978.

MARTINEZ, A.J. Free-Living Amebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology and Treatment of Disease. **CRC Press**, 1985.

MARTINEZ, A.J. Infections of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. **Rev Infect Dis**, v. 13, p. 399–S402, 1991.

MARTINEZ, A.J.; VISVESVARA, G.S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathol**, Pittsburgh, v. 7, p. 583–598, 1997.

MATHERS, W.; STEVENS, G.; RODRIGUEZ, M.; CHAN, C.C.; GOLD, J.; VISVESVARA, G.S.; LEMP, M.A.; ZIMMERMAN, L.E. Immunopathology and electron microscopy of *Acanthamoeba* keratitis. **Am J Ophthalmol**, v. 103, p. 626–635, 1987.

MAZUR, T. & JOZWIAK, M. Extracerebral infections of *Acanthamoeba* spp. in mice. **Wiad. Parazytol**. v. 39, p. 357-66, 1993.

MAZUR, T. E.; HADAS, I.; IWANICKA. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. **Tropical Medicine and Parasitology**, New York, v. 46, p. 106–108, 1995.

MAZUR T.; GUSTAWSKA, L.; HADÁS, E. Extracerebral infections of *Acanthamoeba* spp. in mice. Pathomorphological changes in tissues of infected animals. **Wiad Parazytol**, v 45 (1), p. 83-7, 1999.

MEJRI, N.; GOTTSTEIN, B. *Echinococcus multilocularis* metacestode metabolites contain a cysteine protease that digests eotaxin, a CC pro-inflammatory chemokine. **Parasitol. Res**, v. 105, p. 1253-1260, 2009.

MITRO, K. BHAGAVATHIAMMAI, A.; ZHOU, O-M.; BOBBETT, G.; McKERROW, J.H.; CHOKSHI, R.; CHOKSHI, B.; JAMES, E.R. Partial characterization of the proteolytic secretions of *Acanthamoeba polyphaga*. **Experimental parasitology**, v. 78, p. 377-385, 1994.

MORATAZAVI, P.N.; Goldsworthy, G.; Kirk, R.; Khan, N.A. Novel model for the in vivo study of central nervous system infection due to *Acanthamoeba* spp. (T4 genotype). **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 503–508, 2009.

MORTAZAVI, P.N.; GOLDSWORTHY, G.; KIRK, R.; KHAN, N.A. *Acanthamoeba* produces disseminated infection in locusts and traverses the locust blood-brain barrier to invade the central nervous system. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 186, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.1665, p. 55-63, 1983

NA, B-K.; KIM, J-C.; SONG, C-Y. Characterization and pathogenetic role of proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. **Microbiol Pathogenesis**, v. 30, p. 39-48, 2001.

NAGINGTON, J.; WATSON, P.G.; PLAYFAIR, T.J.; MCGILL, J.; JONES, B.R.; STEELE, A.D.Mc.G. Amoebic infection of the eye. **Lancet**, London, v. 2, p. 1537-1540, 1974.

NIEDERKORN, J.Y., ALIZADEH, H., LEHER, H.; McCULLEY, J.P. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. **Microbes Infect**, Dallas, v. 1, p. 437–443, 1999.

NUPRASERT, W.; PUTAPORNTIP, C.; PARIYAKANOK, L.; JONGWUTIWES, S. Identification of a Novel T17 Genotype of *Acanthamoeba* from Environmental Isolates and T10 Genotype Causing Keratitis in Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48(12), p. 4636–4640, 2010.

ODOM, A., DEL-POETA, M., PERFECT, J., HEITMAN, J. The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685,818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 41, p. 156–161, jan. 1997.

PATEL, D.V.; MCGHEE, C.N. *Acanthamoeba* keratitis: a comprehensive photographic reference of common and uncommon signs. **Clin Experiment Ophthalmol**, v. 37, p. 232-238, 2009.

PENS, C.; COSTA, M.; FADANELLI, C.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. *Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact-lens storage cases and the relationship to user profiles. **Parasitology Research**, Berlin, v. 103, p.1241-1245, nov. 2008.

PETTIT, D.A.; WILLIAMSON, J.; CABRAL, G.A.; MARCIANO-CABRAL, F. *In vitro* destruction of nerve cell cultures by *Acanthamoeba* spp.: a transmission and scanning electron microscopy study. **J. Parasitol**, v. 82, p. 769-777, 1996.

POLAT, Z.A.; OZCELIK, S.; VURAL, A.; YILDIZ, E.; CETIN, A.; Clinical and histologic evaluations of experimental *Acanthamoeba* keratitis. **Parasitol Res**, v. 101, p. 1621-5, 2007.

QVARNSTROM, Y.; VISVESVARA, G.S.; SRIRAM, R.; DA SILVA, A.J.; Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 44, p. 3589-3595, 2006

RADFORD, C.F.; BACON, A.S.; DART, J.K.; MINASSIAN, D.C. Risk factors for *Acanthamoeba* keratitis in contact lens users: a case-control study. **BMJ**, v. 310, p.1567-70, 1995.

RADFORD, C.F.; MINASSIAN, D.C.; DART, J.K. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. **Br J Ophthalmol**, London, v. 86, p. 536–542, 2002.

REN, M.; WU, X. Evaluation of three different methods to establish animal models of *Acanthamoeba* keratitis. **Yonsei Med J**, v. 51(1), p. 121-127, 2010.

RINGSTED, J.; JAGER, B.V.; SUK, D.; VISVESVARA, G.S. Probable *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a Korean child. **Am J Clin Pathol**, v. 66, p. 723-730, 1976.

ROCHA-AZEVEDO, B.; MENEZES, G.C.; SILVA-FILHO, F.C. The interaction between *Acanthamoeba polyphaga* and human osteoblastic cells in vitro. **Microb Pathog**, v. 40, p.8–14, 2006.

ROCHA-AZEVEDO, B & SILVA-FILHO, FC. Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga*: analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. **Arch Microbiol**, v. 188, p. 441–449, 2007.

ROCHA-AZEVEDO, B.; JAMERSON, M.; CABRAL, G. A.; SILVA-FILHO, F. C.; MARCIANO-CABRAL, F. *Acanthamoeba* Interaction with Extracellular Matrix Glycoproteins: Biological and Biochemical Characterization and Role in Cytotoxicity and Invasiveness. **J. Eukaryot. Microbiol.** v. 56(3), p. 270–278, 2009 (a).

ROCHA-AZEVEDO, B.; JAMERSON, M.; CABRAL, G. A.; MARCIANO-CABRAL, F. *Acanthamoeba culbertsoni*: Analysis of amoebic adhesion and invasion on extracellular matrix components collagen I and laminin-1. **Exp. Parasitol.**, 2009 (b).

ROSENBERG, G.A. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. **Glia**, v. 39(3), p. 279-91, 2002.

SAEED, A.; ABD, H.; EDVINSSON, B.; SANDSTROM, G. *Acanthamoeba castellanii* an environmental host for *Shigella dysenteriae* and *Shigella sonnei*. **Arch. Microbial**, v.191, p. 83-88, 2009.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v.43 (6), 2007

SARAVANAN, C.; CAO, Z.; KUMAR, J.; QIU, J.; PLAUNT, A. G.; NEWBURG, D. S.; PANJWAI, N.; Milk Components Inhibit *Acanthamoeba* - Induced Cytopathic Effect. **Investigative Ophthalmology & Visual Science Invest**, v. 49(3), p. 1010 –1015, 2008.

SCHROEDER, J.M.; BOOTON, G.C.; HAY, J.; NISZL, I.A.; SEAL, D.V.; MARKUS, M.B.; FUERST, P.A.; BYERS, T.J. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 39, p. 1903–1911, 2001.

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

SHARMA, S.; SIRINIVASM, M.; GEORGE, C. Diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis – A report of four cases and review of literature. **Indian Journal of Ophthalmology**, London, v. 38(2), p. 50-56, 1990.

SIDDIQUI, R.; EMES, R.; ELSHEIKHA, H.; KHAN, N.A . Area 51: How do *Acanthamoeba* invade the central nervous system? **Trends in parasitology**, v. 04, p. 18, 2011.

SISSONS, J.; ALSAM, S.; GOLDSWORTHY, G.; LIGHTFOOT, M.; JARROL, E.L.; KHAN, N.A. Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis. **BCM Microbiology**, v. 6, p. 42, 2006.

SOTELO-AVILA, C.; TAYLOR, F.M.; EWING, C.W. Clinical-pathological conference. Primary amebic meningoencephalitis in a healthy 7-year-old boy. **J Pediatr**, v. 85, p. 131-6, 1974.

SPANAKOS, G.; TZANETOU, K.; MILTSAKAKIS, D.; PATSOULA, E.; MALAMOU-LADA, E.; VAKALIS, N. C. Genotyping of pathogenic *Acanthamoebae* isolated from clinical samples in Greece—report of a clinical isolate presenting T5 genotype. **Parasitol. Int.**, v. 55, p. 147-149, 2006.

STEHR-GREEN, J.K.; BAILY, T.M.; VISVESVARA, G.S. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. **Am J Ophthalmol**, v. 107, p. 331–336, 1989.

STOTHARD, D.R.; SCHOROEDER-DIEDRICH, J.M.; AWWAD, M.H.; GAST, R.J.; LEDEE, D.R.; RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S.; DEAN, C.L.; FUERST, P.A.; BYERS, T.J.. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, p. 45–54, 1998.

TATINENI, R. et al. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp. **Bioresource Tectinology**, England, v. 99, p. 1596-1602, 2008.

TAYLOR, W.M.; PIDHERNEY, M.S.; ALIZADEH, H.; NIEDERKORN, J.Y. In vitro characterization of *Acanthamoeba castellanii* cytopathic effect. **J Parasitol**, v. 81, p. 603–609, 1995.

TOMLINSON, A.; SIMMONS, P.A.; SEAL, D.V. et al. Salicylate Inhibition of *Acanthamoeba* Attachment to Contact Lenses. **Ophthalmology**, v. 107(1), p.112-7, 2000.

VISVESVARA, G.S.; JONES, D.B.; ROBINSON, N.M. Isolation, identification and biological characterization of *Acanthamoeba polyphaga* from a human eye. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, p. 784-790, 1975.

VISVESVARA, G.S.; SCHUSTER, F.L.; Opportunistic Free-living Amebae, Part I. **Clinical Microbiology Newsletter**, New York, v. 30, p. 151-158, 2008

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Correlations between morphological, molecular, biological and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4408–4413, 2000a.

WALOCHNIK J.; HALLER-SCHOBER E.M; KÖLLI, H.; PICHER, O.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Discrimination between clinically relevant and nonrelevant

Acanthamoeba strains isolated from contact lens-wearing keratitis patients in Austria. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 3932–3936, 2000b.

WALOCHNIK, J.; SOMMER, K.; OBWALLER, A; HALLER-SCHOBBER, E.M.; ASPOCK, H. Characterisation and differentiation of pathogenic and non-pathogenic *Acanthamoeba* strains by their protein and antigen profiles. **Parasitol Res**, v. 92, p. 289-298, 2004.

WINCK, Mari Akine Toderó. **Isolamento, identificação, e caracterização de *Acanthamoeba* a partir de fontes de água**. Mestrado (Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011;

YOUNG, A.L.; LeBOEUF, N.R.; TSIOURIS, S.J.; HUSAIN, S.; GROSSMAN, M.E. Fatal disseminated *Acanthamoeba* infection in a liver transplant recipient immunocompromised by combination therapies for graft-versus-host disease. **Transpl Infect Dis**, v.12, p. 529-537, 2010.

ANEXOS

ANEXO A. Carta de Aprovação De Comissão de Ética na Utilização de Animais.

	U F R G S UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética Na Utilização De Animais	
---	--	---	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética Na Utilização De Animais analisou o projeto:

Número: 18487
Título: Isolamento e caracterização de proteases extracelulares produzidas por isolados ambientais e cepas padrão de Acanthamoeba

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARILISE BRITTES ROTT - coordenador desde 01/03/2010
ADRIANO BRANDELLI - pesquisador desde 01/03/2010
Ana Paula Folmer Correa - pesquisador desde 01/03/2010
Carolina de Marco Verissimo - pesquisador desde 01/03/2010

Comissão De Ética Na Utilização De Animais aprovou o mesmo, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 23 de Fevereiro de 2011



FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética

1