

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Interação entre *Acanthamoeba castellanii* e *Fusarium solani*: um possível problema no contexto da ceratite

Dissertação de Mestrado

Thais Esther Teixeira Nunes

Porto Alegre, 2014.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Interação entre *Acanthamoeba castellanii* e *Fusarium solani*: um possível problema no contexto da ceratite

Thais Esther Teixeira Nunes

Bióloga – UFRGS

Dissertação de Mestrado apresentada como um dos
pré-requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Orientador: Profa. Dra. Marilise Brittes Rott

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil

Março de 2014.

CIP - Catalogação na Publicação

Nunes, Thais Esther Teixeira
Interação entre *Acanthamoeba castellanii* e
Fusarium solani: um possível problema no contexto da
ceratite / Thais Esther Teixeira Nunes. -- 2014.
74 f.

Orientadora: Marilise Brittes Rott.
Coorientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

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, 2014.

1. *Acanthamoeba*. 2. *Fusarium*. 3. Interação. 4.
Ceratite. I. Rott, Marilise Brittes, orient. II.
Fuentefria, Alexandre Meneghello, coorient. III.
Título.

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado coragem de persistir no mestrado.

Aos professores Marilise Brittes Rott e Alexandre Meneghello Fuentefria, pela orientação e apoio ao longo desses dois anos.

Aos meus colegas do Departamento de Bioquímica, especialmente à Lia.

A todos colegas do laboratório de Parasitologia por compartilhar o conhecimento e principalmente, a amizade. Agradeço muito à Nathalya que me ajudou em boa parte do projeto.

Aos meus amigos pelo apoio e compreensão da minha frequente ausência.

À minha família, por sempre ter me dado suporte, especialmente minha mãe, Sandra Nunes. Sem ela esse trabalho não teria avançado. Dedico a ti o meu mestrado.

INTERAÇÃO ENTRE *ACANTHAMOEBA CASTELLANII* E *FUSARIUM SOLANI*: UM POSSÍVEL PROBLEMA NO CONTEXTO DA CERATITE ¹

Autor: Thais Esther Teixeira Nunes

Orientador: Marilise Brittes Rott

Co-Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria

Resumo

A incidência de ceratite infecciosa relacionada a lentes de contato ocasionada por espécies de *Acanthamoeba* e *Fusarium* tem aumentado nos últimos anos. Esses organismos compartilham vários ambientes e casos de coinfeção foram relatados. Interações entre amebas e outros microorganismos podem resultar em mudanças significativas para ambos, como o aumento da virulência em hospedeiros mamíferos. Neste estudo, foi avaliada a interação das cepas Neff, T4 e T4 pulmão de *Acanthamoeba castellanii* com *Fusarium solani*, bem como as possíveis implicações no desenvolvimento de ceratite. *A. castellanii* foi capaz de fagocitar *F. solani* e os conídios foram capazes de germinar dentro da ameba. A cocultura com ameba viva, bem como o sobrenadante da cultura e o lisado amebiano aumentaram significativamente o crescimento do fungo. Além disso, *F. solani* vivo e o seu sobrenadante de cultura aumentaram a sobrevivência da ameba, mas de forma diferente em cada cepa amebiana. A presença do fungo resultou em aumento de encistamento das cepas amebianas T4 pulmão e T4, bem como aumentou a resistência da cepa Neff à clorexidina. Curiosamente, a passagem pela ameba aumentou o efeito citopático de *F. solani* em células de mamíferos. Esses resultados mostram que *A. castellanii* e *F. solani* têm uma relação de protocooperação, com benefícios para ambos, e especialmente, indicam um possível efeito sobre as características de virulência de ambos os organismos. Assim a interação entre *A. castellanii* e *F. solani* pode resultar em impactos graves nos casos de ceratite.

Palavras chave: *Acanthamoeba*, *Fusarium*, interação, ceratite, virulência.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (74 p.) Março, 2014.

ACANTHAMOEBA CASTELLANII AND FUSARIUM SOLANI INTERACTION: A POSSIBLE PROBLEM IN KERATITIS¹

Author: Thais Esther Teixeira Nunes
Supervisor: Marilise Brittes Rott
Co-Supervisor: Alexandre Meneghello Fuentefria

Abstract

The incidence of *Acanthamoeba* and *Fusarium* species has increased in contact lens-related infectious keratitis. They share several environments and cases of co-infection have been reported. The interaction between the amoeba and other microorganisms may result in significant changes for both, like increased virulence in mammalian hosts. In this study, we evaluated the interaction of Neff, T4 and T4 lung strains of *Acanthamoeba castellanii* with *Fusarium solani* and the implications in keratitis. *A. castellanii* phagocytosed the fungi, and conidia were able to germinate inside the amoeba. The co-culture with live amoeba as well as the amebic culture supernatant and lysate significantly increased fungal growth. Moreover, live *F. solani* and its culture supernatant enhanced the survival of amoeba, but differently in each *A. castellanii* strain. The presence of fungi resulted in increased amoebal encystment of T4 and T4 lung strains, and increased the resistance of Neff strain to chlorhexidine. The encystment of T4 and T4 lung strains was increased by the fungi. Interestingly, the passage by Neff amoeba increased the cytopathic effect of *F. solani* on mammalian cells lineage. These results show that *A. castellanii* and *F. solani* have a proto-cooperation relationship, with benefits for both, and especially indicate a possible effect on virulence characteristics of both organisms. These data suggest that the *A. castellanii*-*F. solani* interaction may cause severe impacts in keratitis.

Keywords: *Acanthamoeba*, *Fusarium*, interaction, keratitis, virulence.

¹ Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (74 p.) March, 2014

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. Referencial teórico	14
2.1. O gênero <i>Acanthamoeba</i>	14
2.2. O gênero <i>Fusarium</i>	16
2.3. Interação entre amebas de vida livre e micro-organismos.....	18
2.4. Ceratite microbiana.....	21
3. Objetivos	28
4. Materiais e Métodos	29
4.1. Local de desenvolvimento do projeto.....	29
4.2. Micro-organismos	29
4.3. Índice de fagocitose	30
4.4. Cocultivo de <i>A. castellanii</i> e <i>F. solani</i>	30
4.4.1 Viabilidade fúngica	30
4.4.2 Efeito do sobrenadante da cultura e do lisado amebianos sobre o crescimento fúngico	31
4.4.3 Viabilidade amebiana.....	32
4.5. Influência de <i>F. solani</i> no processo de encistamento de <i>A. castellanii</i>	32
4.6. Perfil de suscetibilidade aos antiamebianos.....	33
4.7. Efeito citopático de <i>F. solani</i> contra células VERO.....	34
4.8. Análise Estatística.....	35
5. Resultados e discussão.....	37
5.1. Fagocitose de <i>F. solani</i> pelas cepas de <i>A. castellanii</i>	37
5.2. Viabilidade fúngica em cocultivo com <i>A. castellanii</i>	38
5.3. Viabilidade amebiana em cocultivo com <i>F. solani</i>	46
5.4. Influência de <i>F. solani</i> no processo de encistamento de <i>A. castellanii</i>	51
5.5. Perfil de suscetibilidade a antiamebiano	54
5.6. Efeito citopático de <i>F. solani</i> sobre células VERO	57
5.7. Implicações na ceratite	60
6. Conclusões	62
7. Referências.....	64
8. Anexos.....	73

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1	Fagocitose de <i>F. solani</i> pelas cepas T4 e Neff, e isolado T4 pulmão de <i>A. castellanii</i> . O índice de fagocitose foi calculado por meio da contagem do número de amebas com conídios internalizados em razão do número total de amebas. Os resultados representam a média e o desvio padrão de cada cepa em triplicata. Asterisco e suspenso indicam variação significativa entre as três cepas em cada tempo ($p < 0,05$)	38
----------	---	----

RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1 Cocultivo de *F. solani* com *A. castellanii* – cepa T4 (barras listradas), isolado T4 pulmão (barras cinza) e cepa Neff (barras cinza escuro) – e sozinho em PBS (barras brancas). Crescimento de *F. solani* avaliado pela (A) contagem de conídios e (B) UFC. Letras em minúsculo indicam variação significativa ($p < 0.05$). Cada barra representa a média das amostras em triplicata e a barra de erro, o desvio padrão..... 41
- Figura 2 Observação por meio de microscopia óptica de um trofozoíto de *A. castellanii* com conídio de *F. solani* internalizado. O trofozoíto possui um conídio germinado (A) a hifa recém formada começa a sair da ameba (setas em branco). Observa-se, na figura B, que o trofozoíto também apresenta um conídio não germinado (seta em preto). O traço corresponde a 50 μ m..... 42
- Figura 3 Crescimento de *F. solani* com *A. castellanii* viva (barras listradas), sobrenadante da cultura amebiana (barras cinza), ameba lisada (barras cinza escuro) e sozinho em PBS (barras brancas). As amebas testadas foram: (A) T4, (B) T4 pulmão e (C) Neff. Letras em minúsculo indicam variação significativa ($p < 0.05$). Cada barra representa a média das amostras em triplicata e a barra de erro, o desvio padrão. 45
- Figura 4 Viabilidade amebiana cultivada com *F. solani* vivo (barras listradas), sobrenadante da cultura fúngica (barras cinza), fungo inativado (barras cinza escuro) e ameba sozinha em PBS (barras brancas). As amebas testadas foram: (A) T4, (B) T4 pulmão e (C) Neff. Letras em minúsculo indicam variação significativa ($p < 0.05$). Cada barra representa a média das amostras em triplicata e a barra de erro, o desvio padrão..... 49
- Figura 5 Influência de *F. solani* no processo de encistamento. A Percentagem de cistos das cepas e do isolado de *A. castellanii* foi determinada na presença e na ausência do fungo. O número de cistos e trofozoítos foram contados em três poços para cada uma das condições. Asterisco representa variação significativa ($p < 0,05$)..... 54
- Figura 6 Perfil de suscetibilidade de *A. castellanii* a clorexidina após cultivo com o sobrenadante da cultura fúngica (barras cinza) ou com PBS (barras brancas). Foram testadas duas cepas amebianas: (A) T4 e (B) Neff. Cada uma das condições foi realizada em duplicata. Asterisco representa variação significativa ($p < 0,01$)..... 56

Figura 7 Efeito citopático de *F. solani*, antes e após contato com as cepas Neff, T4 e o isolado T4 pulmão de *A. castellanii*. O efeito citopático foi avaliado por meio da mortalidade das células Vero após a exposição a *F. solani* (isoladamente) por 24h. Asterisco indica variação significativa da mortalidade das células VERO comparando os tratamentos com o fungo sem exposição à ameba (representado pela barra "*F. solani*") e o fungo após o contato as cepas amebianas ($p < 0,05$).....

58

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA – Análise da Variância

ATCC – *American Type Culture Collection*

AVL – amebas de vida livre

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

EAG – Encefalite Amebiana Granulomatosa

FDA – Food and Drug Administration

mg – Miligrama

mL – Mililitro

MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

°C – Graus Celsius

PBS – Phosphate buffered saline (Tampão Fosfato Salino)

PYG – meio proteose peptona, extrato de levedo e glicose

UFC – Unidades Formadoras de colônia

µg – Micrograma

µl – Microlitro

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, amebas de vida livre (AVL), dentre elas *Acanthamoeba* spp. ganharam crescente atenção da comunidade científica devido aos seus diversos papéis no ecossistema e por causarem sérias infecções humanas, por vezes fatais. *Acanthamoeba* spp. são uma das amebas de vida livre de maior prevalência no ambiente. Essa ameba apresenta dois estágios em seu ciclo de vida, um trofozoíto vegetativo e um estágio de cisto resistente. *Acanthamoeba* spp. alimenta-se ativamente de diversos organismos, porém alguns deles evoluíram tornando-se resistentes aos protistas, uma vez que não são internalizados ou são capazes de sobreviver, crescer e sair das amebas após internalização. É sugerido que essas interações podem ajudar a transmitir os micro-organismos a hospedeiros suscetíveis e/ ou contribuir para a patogenicidade destes. Em relação à interação de amebas com fungos, tem sido reportado que estes micro-organismos interagem de modo a promover a sobrevivência dos fungos e a sua transmissão a hospedeiros suscetíveis, além de poderem aumentar a sua virulência. *Fusarium* spp. são fungos filamentosos amplamente dispersos no ambiente. Algumas espécies de *Fusarium* spp. podem ocasionar micoses oportunistas em humanos, geralmente em pacientes imunocomprometidos. Em indivíduos imunocompetentes, está associado principalmente à ceratite.

Acanthamoeba castellanii e *Fusarium solani* são importantes agentes etiológicos de ceratite infecciosa e têm sido implicados em surtos dessa doença. Considerando que esses micro-organismos coexistem em

diversos ambientes naturais e artificiais, inclusive casos de coinfeção já foram relatados é razoável assumir que eles apresentem algum tipo de interação. Portanto, o objetivo do presente projeto foi caracterizar as interações entre *A. castellanii* e *F. solani* e suas implicações em características intrínsecas de ambos organismos, visando as possíveis consequências dessa interação na ceratite.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. O gênero *Acanthamoeba*

As amebas constituem o maior e mais diversificado grupo de organismos dentre os protistas e estão entre os primeiros eucariotos estudados desde a descoberta do primeiro microscópio. Nas últimas décadas, esses organismos ganharam uma crescente atenção devido aos seus diversos papéis no ecossistema e por causarem sérias infecções humanas (Khan, 2006; Siddiqui & Khan, 2012a). *Acanthamoeba* foi descrita pela primeira vez por Castellani em 1930, como um contaminante da cultura de *Cryptococcus pararoseus*. Porém o gênero foi estabelecido mais tarde e descrito como o agente etiológico da encefalite granulomatosa por *Acanthamoeba* e ceratite nas décadas 1960 e 1970, respectivamente (Siddiqui & Khan, 2012a). *Acanthamoeba* é ubiquamente distribuída em diversos ambientes naturais e artificiais, tais como, solo, pó, ar, água natural e tratada, piscinas, saunas, ar-condicionado, hospitais e unidades de diálise, água de torneira, lentes de contato e estojos de lentes, entre outros (Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

Apesar de existirem naturalmente como organismos de vida livre, essas amebas são capazes de sobreviver em tecidos de seres humanos e outros animais, tornando-se agentes causadores de graves doenças (Jones, 1975; Visvesvara & Schuster, 2008), sendo por isso denominadas anfizóicas. Dentre as infecções causadas por *Acanthamoeba*, duas delas são bastante conhecidas: a Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG), tipicamente limitada a pacientes imunocomprometidos e que quase sempre leva a óbito, e uma

ceratite muito dolorosa que pode levar à cegueira (Illingworth & Cook, 1998; Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

Acanthamoeba spp. apresenta dois estágios em seu ciclo de vida: trofozoíto vegetativo e cisto dormente. O trofozoíto alimenta-se ativamente de bactérias, algas, leveduras ou pequenas partículas orgânicas (Khan, 2006), representando um grande impacto na dinâmica dos biofilmes multimicrobianos (Rodriguez-Zaragoza, 1994). Os acantopódios, microprojeções formadas por citoplasma hialino em forma de espinhos, são importantes nos movimentos celulares e na captura de presas (Khan, 2006). Após a captura de partículas em vacúolos, *Acanthamoeba* é capaz de distinguir vacúolos contendo partículas digeríveis, como demonstrado por Bowers & Olszewski (1983). Nesse estudo, os vacúolos contendo partículas alimentares foram retidos e digeridos, enquanto as esferas de látex foram exocitadas. No entanto, em condições adversas, tais como falta de nutrientes, dessecação, pH e temperaturas extremas, os trofozoítos se diferenciam formando cistos de parede dupla (Aksozek *et al.*, 2002; Marciano-Cabral & Cabral, 2003). A parede externa (ectocisto) é proteica, enquanto a parede interna (endocisto) contém celulose, que não está presente nos trofozoítos.

Os cistos são resistentes a pH e temperaturas extremas, bem como soluções de lentes de contato (Illingworth & Cook, 1998). Além disso, Mazur *et al.* (1995) demonstraram que a viabilidade dos cistos de *Acanthamoeba* em ambientes naturais, bem como em laboratório, armazenadas em água a 4°C, é de aproximadamente 25 anos. Presume-se que em ambiente natural, as propriedades invasivas podem ser mantidas mesmo após longos períodos de

encistamento (Mazur *et al.*, 1995). Cistos de *Acanthamoeba* spp. causadoras de ceratite têm sobrevivido em torno de 14 a 90 dias em soluções oftalmológicas, incluindo desinfetantes usados para limpeza de lentes (Brandt *et al.*, 1989). Entretanto, o potencial de encistamento pode ser perdido após a transferência de *Acanthamoeba* para culturas axênicas em um período curto de cultivo (Koesler *et al.*, 2008).

2.2. O gênero *Fusarium*

Fusarium spp. são fungos filamentosos hialinos saprofíticos, mundialmente distribuídos no solo, onde podem persistir por vezes, durante vários anos, e frequentemente associados a raízes de plantas, sendo um comum patógeno vegetal. São comumente encontrados em regiões tropicais e temperadas. A sua ampla distribuição pode ser atribuída à capacidade de crescer em uma grande variedade de substratos e a seus mecanismos eficientes de dispersão (Nelson *et al.*, 1994). O gênero é bastante importante por incluir cepas patogênicas a plantas e cepas capazes de produzir micotoxinas, as quais podem ter um impacto na saúde humana e animal, e na segurança dos alimentos (Merhej *et al.*, 2011; Woloshuk & Shim 2013).

Além de sua ação como um agente patogênico de plantas, *Fusarium* é reconhecido como um sério patógeno emergente em seres humanos devido ao aumento do número de casos graves relatados (Boutati & Anaissie, 1997; Odds *et al.* 1998). As infecções causadas por espécies de *Fusarium* podem ser superficiais ou limitadas a um único órgão em indivíduos saudáveis; tais infecções são raras e tendem a responder bem ao tratamento. Já a fusariose disseminada afeta pacientes imunocomprometidos e

frequentemente é fatal (Nucci & Anaissie, 2007). Dentre as mais de 50 espécies de *Fusarium* identificadas, poucas são capazes de causar infecções em humanos, sendo *F. solani* o agente etiológico mais frequente nos casos de fusariose, excluindo onicomicoses (Nucci & Anaissie, 2007). Enquanto a suscetibilidade do hospedeiro é um dos principais determinantes para o estabelecimento da infecção, também é claro que *Fusarium* spp. possui vários atributos celulares e moleculares que, em conjunto, podem conferir diferentes graus de virulência a estes organismos. Toxinas, produção de enzimas e adesão em materiais protéticos têm sido postulados como fatores de virulência para *Fusarium* spp (Nelson *et al.*, 1994). Um estudo recente usando *Galleria mellonella* como hospedeiro de *Fusarium* demonstrou que a morfologia dos conídios teve correlação com a mortalidade das larvas, sendo os macroconídios mais virulentos que os microconídios (Coleman *et al.*, 2011).

Dada a ubiquidade das espécies de *Fusarium* no meio ambiente, fusariose pode potencialmente ser adquirida na comunidade, visto que alguns trabalhos identificaram a presença de conídios de *Fusarium* spp. em amostras de ar externo (Boutati *et al.*, 1997; Anaissie *et al.*, 2001; Raad *et al.*, 2002). Além disso, o sistema hidrico de hospitais tem sido relatado como um potencial reservatório de infecções nosocomiais por *Fusarium*, já que amostras desses ambientes revelaram a presença do micro-organismo (Anaissie *et al.*, 2001). O'Donnell *et al.* (2004) reportaram que uma linhagem clonal de *Fusarium* geograficamente distribuída foi responsável por 70% dos isolados clínicos e geneticamente semelhante aos isolados dos sistemas de água de três hospitais dos Estados Unidos.

2.3. Interação entre amebas de vida livre e micro-organismos

Embora as amebas de vida livre sejam os consumidores dominantes de bactérias, reduzindo até 60% da população bacteriana (Sinclair *et al.*, 1981), alguns micro-organismos evoluíram para resistir à destruição por amebas de vida livre, sendo considerados “micro-organismos resistentes à ameba”. Esses micro-organismos podem resistir à ameba devido: (1) a sua capacidade de escapar da predação e crescer na presença das amebas, que normalmente fagocitam e digerem micro-organismos não resistentes; (2) a sua habilidade em resistir à digestão intracelular e possível sobrevivência nos cistos amebianos; e (3) a sua capacidade em resistir à digestão, mas também, de multiplicação dentro dos trofozoítos (Thomas *et al.*, 2010). Cerca de 20 a 24% dos isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* carregam bactérias e patógenos intracelulares obrigatórios, tais como *Chlamydia* e *Legionella* (Greub & Raoult, 2004; Schmitz-Esser *et al.*, 2008). É sugerido que essas interações podem ajudar a transmitir os micro-organismos a hospedeiros suscetíveis, alguns dos quais são potenciais patógenos humanos e/ ou contribuir para a patogenicidade de *Acanthamoeba* spp. Assim as amebas comportam-se como “cavalo de Tróia” do mundo microbiano, por abrigar e levar micro-organismos para dentro do ser humano protegendo-os da primeira linha de defesas humanas. Além disso, diversos estudos têm demonstrado a capacidade das AVL na seleção de características de virulência, além de contribuir na adaptação dos micróbios aos macrófagos (Greub & Raoult, 2004; Siddiqui & Khan, 2012a).

Devido às diversas semelhanças que amebas e macrófagos compartilham, tem sido sugerido que a adaptação de micro-organismos às amebas serviu evolutivamente como uma pré-adaptação ao ambiente interno de macrófagos, uma etapa importante no processo para se tornar um patógeno humano. Por exemplo, a ameba tem sido designada como um “berço evolutivo” que levou à adaptação de *Legionella pneumophila* à vida dentro de macrófagos humanos. De fato, as estratégias usadas pela bactéria para sobreviver em macrófagos e amebas são muito similares, tais como, a prevenção da fusão do fagossomo ao lisossomo, a replicação dentro do fagossomo, o escape através da lise celular, dentre outros (Greub & Raoult, 2004).

Acanthamoeba também tem sido implicada no aumento da sobrevivência de bactérias no ambiente, na resistência bacteriana aos biocidas e na virulência dos micro-organismos. Barker *et al.* (1995) demonstraram que *L. pneumophila* testada logo após o cocultivo com *A. polyphaga* apresentou resistência cerca 1000X superior à rifampicina e ciprofloxacina, em comparação à bactéria cultivada sozinha. Outro estudo mostrou que a infecção de *Acanthamoeba* por *Mycobacterium avium* resultou na diminuição da atividade de rifabutina e macrolídeos contra a bactéria (Miltner & Bermudez, 2000). Entretanto esse efeito pode ser devido à diminuição da absorção de antibióticos dentro da ameba, à inativação do composto dentro da ameba ou à alteração no fenótipo bacteriano (Greub & Raoult, 2004). Ademais, o cocultivo com *Acanthamoeba castellanii* aumenta a capacidade de invasão de *Legionella pneumophila* em células epiteliais e monócitos humanos *in vitro*, além de aumentar a virulência em camundongos (Cirillo *et al.*, 1994; Cirillo *et al.*, 1999).

O mesmo fenômeno foi observado em *Mycobacterium avium* (Cirillo *et al.*, 1997).

Em relação à interação de amebas com fungos ambientais, sem requerimentos óbvios para associação com animais, tem sido proposto que as pressões seletivas geradas por predadores amebianos levaram ao surgimento de características fúngicas, as quais também podem promover a sobrevivência em mamíferos. Estudos, principalmente com *Cryptococcus*, fornecem subsídios para a hipótese de que a virulência fúngica pode ter sido selecionada e mantida por pressões seletivas no ambiente, incluindo a predação por ameba. Inicialmente, diversos aspectos da interação de *Cryptococcus neoformans* com a ameba se assemelham com as interações com macrófagos, como a saída de leveduras das células fagocitárias através da exocitose não lítica. Além disso, alguns dos fatores de virulência usados por *C. neoformans* na infecção amebas e macrófagos são os mesmos (Steenbergen *et al.*, 2001; Chrisman *et al.* 2010). Van Waeyenberghe *et al.* (2013) reportaram que *A. castellanii* internaliza conídios de *A. fumigatus*, resultando na germinação intracelular do fungo ou na exocitose de conídios, sendo essa interação altamente semelhante a que ocorre entre *A. fumigatus* e macrófagos de mamíferos e de aves. Ademais, a virulência murina de *C. neoformans* e *Histoplasma capsulatum* pode ser aumentada pela passagem em *Dictyostelium discoideum* e *A. castellanii*, respectivamente (Steenbergen *et al.*, 2003; Steenbergen *et al.*, 2004). Finalmente, a transição de leveduras a hifas em fungos dimórficos pode ser desencadeada pela ameba em temperaturas não permissivas. A transição de levedura à hifa está associada à virulência em vários fungos dimórficos e

ocorre quando a temperatura é alterada do ambiente (25°C, forma de hifas) ao hospedeiro mamífero (37°C, forma leveduriforme). Assim, a indução de hifas em temperatura não permissiva de 37°C pelas amebas implica que essa característica também pode ser consequência da seleção ambiental, possivelmente, como outro mecanismo de escape da predação; como o observado com *C. neoformans*, em que as pseudo-hifas resistiram à predação (Neilson *et al.*, 1978; Steenbergen *et al.* 2004).

2.4. Ceratite microbiana

Ceratite infecciosa é uma inflamação da córnea causada por diversos agentes, tais como bactérias, fungos, vírus e protozoários; é caracterizada pela inflamação, frequentemente com infiltração de leucócitos no estroma e é considerada uma emergência oftálmica requerendo imediata atenção. A disfunção visual permanente tem sido relatada em um número significativo de pacientes em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Shah *et al.*, 2011). O uso de lentes de contato é o principal fator de ceratite microbiana que potencialmente pode levar à cegueira. A presença das lentes de contato influencia no desenvolvimento de infecções, já que o material da lente atua como um vetor na aderência de micro-organismos com posterior transferência para a superfície ocular (Szczołka-Flynn *et al.*, 2010).

Embora os principais agentes causadores da ceratite microbiana sejam de origem bacteriana, recentemente micro-organismos atípicos, como espécies de *Fusarium* e de *Acanthamoeba*, têm aumentado em incidência de infecções. Na década passada, ocorreram duas epidemias significativas de ceratite associadas ao uso de solução para lentes de contato, ocasionadas por

Fusarium e *Acanthamoeba* (O'Brart *et al.*, 2011). Entre 2005 e 2006, surtos de ceratite causada por *Fusarium*, nos Estados Unidos e em Singapura, foram associadas ao uso de lentes de contato e à solução de limpeza ReNu/MoistureLoc (Bausch and Lomb, Rochester, Nova Iorque, EUA), (Khor *et al.*, 2006; Chang, 2006). Nos Estados Unidos foi reportado um crescente número de casos de ceratite por *Acanthamoeba* entre 2003 a 2007, grande parte deles, relacionados ao uso da solução de limpeza e conservação de lentes de contato AMO Complete MoisturePlus (AMO, Santa Ana, Califórnia, EUA) (O'Brart *et al.*, 2011). Ambas soluções foram retiradas dos estabelecimentos comerciais, embora esses produtos tenham preenchido todos os critérios de FDA (Food and Drug Administration, Estados Unidos) para a segurança e eficácia, e novas investigações mostraram ausência de contaminação microbiana de qualquer solução. As soluções de lentes de contato em geral são mais eficazes contra bactérias em comparação com as espécies de fungos ou de *Acanthamoeba* spp. Segundo as recomendações de FDA para obter aprovação do produto, é necessário a redução de 1log das unidades formadoras de colônia de fungos e não existe padrão para *Acanthamoeba* (Patel & Hammersmith, 2008).

A ceratite por *Acanthamoeba* é uma infecção invasiva da córnea, que se caracteriza pela perda gradual da visão, chegando, em alguns casos, a provocar cegueira (Radford *et al.*, 1998). Uma manifestação clínica da ceratite por *Acanthamoeba* é a neurite radial, com dor severa que não é compatível com a extensão de dano tecidual. Essa dor incomensurável não é observada em outras ceratites infecciosas (Clarke & Niederkorn, 2006). Estudos *in vitro*

demonstraram uma predileção dos trofozoítos de *Acanthamoeba* em responder quimiotaticamente a células derivadas da crista neural, e os trofozoítos podem matar as células nervosas por meio de citólise direta e apoptose (Pidherney *et al.*, 1993; Pettit *et al.*, 1996). Outros sintomas incluem fotofobia, ptose palpebral, hiperemia conjuntival, e úlceras epiteliais. Nos estágios mais avançados da doença, é frequente o aparecimento de um infiltrado em forma de anel no estroma. Inicialmente o trofozoíto adere-se ao epitélio da córnea, geralmente em microtraumatismos, destrói esse epitélio, penetra a membrana de Bowman e promove a descamação do estroma. Diferente de outras infecções oculares, a ceratite por *Acanthamoeba* raramente progride além do endotélio da córnea para gerar infecções intraoculares e endofitalmite. A cascata de patogênese de *Acanthamoeba* parece parar antes da invasão do endotélio corneano e da câmara anterior do olho (Clarke & Niederkorn, 2006). Porém, se não for diagnosticada cedo e tratada agressivamente, podem ocorrer danos extensivos oculares e a enucleação pode ser necessária. Atualmente, o diagnóstico e o tratamento da doença não são simples (Panjwani, 2010). Um fator complicador para o tratamento de ceratite é a capacidade de sobrevivência de *Acanthamoeba* dentro do tecido corneano, na forma cística, que por ser de difícil eliminação pode levar à recorrência da infecção. Em países desenvolvidos, 85% dos casos de ceratite amebiana são diagnosticados em usuários de lentes de contato, considerando-se esse o principal fator de risco (Saravanan *et al.*, 2008). As condições que promovem a doença incluem o uso de lentes de contato por períodos prolongados, soluções de limpeza e conservação contaminadas, a falta de higiene pessoal, limpeza inadequada

das lentes de contato, formação de biofilme nas lentes de contato e exposição à água contaminada (Khan, 2006).

Cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* são capazes de aderir em todos os tipos de lentes de contato (Joslin *et al.*, 2007) e a formação de biofilmes nas lentes pode causar o aumento da afinidade amebiana por estes aparatos. Estudos mostraram que *Acanthamoeba* adere mais às lentes cobertas com biofilme do que quando comparadas às lentes sem biofilme (Simmons *et al.*, 1998; Tomlinson *et al.*, 2000; Beattie *et al.*, 2003). Além disso, os biofilmes podem aumentar a persistência dos trofozoítos nas lentes quando estas se encontram nos estojos de conservação, provendo nutrientes para o protozoário. Estudos recentes demonstram um significativo aumento no número de pacientes acometidos por ceratite causada por *Acanthamoeba* spp. em diversos países, incluindo o Brasil (Carvalho *et al.*, 2009; Ku *et al.*, 2009; Cariello *et al.*, 2011). Esse fato é bastante preocupante, visto que, atualmente mais de 120 milhões de pessoas são usuárias de lentes de contato, em todo o mundo (Siddiqui & Khan, 2012a).

A ceratite micótica se apresenta como uma infecção supurativa e ulcerativa da córnea e sua prevalência é maior em climas tropicais e subtropicais. Em ceratites fúngicas filamentosas, as principais manifestações clínicas que podem auxiliar o diagnóstico incluem a presença de lesões corneanas com aspecto seco, ulcerações com margens hifadas e com fundo esbranquiçado ou acinzentado, áreas elevadas, infiltrados associados a lesões satélites, presença de placa endotelial e hipópio (Thomas, 2003b). Os fungos mais frequentemente implicados parecem variar de acordo com a localização

geográfica e o período durante o qual a infecção é observada (Manbon, 1998; Thomas, 2003a), Em diversos estudos *Fusarium* spp. tem sido o isolado mais frequente dentre os casos de ceratite micótica (Ibrahim *et al.*, 2009; Cariello *et al.*, 2011; He *et al.*, 2011). Dentre as espécies de *Fusarium*, *F. solani* é o mais virulento e um dos fatores possivelmente implicados nisso é a resistência deste organismo a várias medicações antifúngicas (Lin *et al.*, 2005). A infecção pode permanecer indolente ou até mesmo progredir na presença de medicação antifúngica, necessitando tratamento cirúrgico. A infecção usualmente é severa, uma vez que *F. solani* pode destruir completamente o olho dentro de algumas semanas, e pode causar perfuração, lesão profunda e glaucoma maligno (Thomas, 2003b).

Estudos epidemiológicos indicam que a patogênese da doença envolve lesões traumáticas por material vegetal ocorridas durante o trabalho no campo, facilitando a entrada de conídios de *Fusarium* no estroma da córnea. Uma vez presente neste sítio, a germinação e a invasão de hifas nos tecidos se iniciam (Tarabishy *et al.*, 2008). Além do trauma, uso de lentes de contato, doenças sistêmicas e imunossupressão podem vencer as defesas naturais do olho e predispor à ceratite por *Fusarium* (Hua *et al.*, 2010). Entretanto, ceratite fúngica entre os usuários de lentes de contato é relativamente rara, compreendendo menos de 5% das ceratites microbianas em pacientes que utilizam lentes de contato para erros refrativos, tais como, miopia e astigmatismo (Khor *et al.*, 2006).

Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento de infecções fúngicas da córnea, cerca de 15 a 27% dos pacientes necessitam de

intervenção cirúrgica devido a falhas na terapia médica ou ao estágio avançado da doença no momento da apresentação. O tratamento da ceratite fúngica é ainda em grande parte empírico, sem consenso sobre o papel de testes de susceptibilidade na escolha da terapia mais adequada. No entanto, a resistência *in vitro* de isolados de *Fusarium* contra muitos agentes antifúngicos em uso já foi relatado como comum, principalmente para *F. solani* (Oechsler *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2005). Tem sido proposto que a progressão rápida da ceratite micótica nas fases iniciais é principalmente devida a características do agente, como grande inoculo fúngico e penetração profunda do estroma, resposta inflamatória insuficiente e possivelmente relativa ineficácia dos agentes antifúngicos (Vemuganti *et al.*, 2002).

O maior estudo epidemiológico de ceratites microbianas na América do Sul, feito em um centro de referência no Brasil (amostras recebidas entre 1975 e 2007) demonstrou que em cerca de 81% das culturas positivas foram isoladas bactérias, em 11% fungos e em 7% *Acanthamoeba* (Cariello *et al.*, 2011). Dentre os casos de ceratite fúngica, o agente etiológico mais frequente foi *Fusarium* spp., correspondendo a 52% dos casos. Além disso, o uso de lentes de contato e trauma ocular foram fatores de risco para ceratites por *Acanthamoeba* e fúngica, respectivamente. Este estudo ainda apontou uma crescente incidência de ceratite infecciosa a partir da segunda metade da década de 1980 a 2001, seguido por uma ligeira diminuição.

Embora raros, casos de coinfeção de *Fusarium* e *Acanthamoeba* já foram relatados e o uso de lentes de contacto tem sido relacionado à maioria deles (Babu & Murthy, 2007; Lin *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; O'Brart *et al.*,

2011). Essa infecção mista pode ser difícil de manejar, visto que *Acanthamoeba* spp. e *Fusarium* spp. são resistentes aos antimicrobianos empíricos prescritos no início da infecção. Além disso, especula-se que a ameba pode progredir mais rápido por usar o fungo como fonte de alimento (Lin *et al.*, 2009). Tipicamente nos casos relatados, *Acanthamoeba* spp. foi descoberta e tratada com terapia antiprotozoários antes de *Fusarium* ser identificado e tratado com antifúngicos. Frequentemente a ceratite fúngica só é diagnosticada após ceratoplastia e exame histológico do botão da córnea (O'Brart *et al.*, 2011).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a interação de *Fusarium solani* e *Acanthamoeba castellanii*, através de um modelo de cocultivo como fator modulador de características intrínsecas de ambos micro-organismos, bem como as suas possíveis implicações na ceratite. Os objetivos específicos estão descritos a seguir:

Verificar a internalização de conídios de *F. solani* por *A. castellanii*, determinada através do índice de fagocitose e do cocultivo em diferentes tempos de incubação.

Determinar o crescimento de *F. solani* em cocultivo com *A. castellanii*, bem como, identificar qual componente amebiano desencadeia seu crescimento.

Analisar o efeito de *F. solani*, vivo e inativado e do sobrenadante da sua cultura sobre a viabilidade amebiana.

Estudar o efeito de *F. solani* sobre o processo de encistamento amebiano.

Determinar o perfil de susceptibilidade de *A. castellanii* a antiamebianos após o contato com o sobrenadante da cultura fúngica.

Analisar o efeito citopático de *F. solani* após a sua associação com *A. castellanii* sobre células de mamíferos.

Identificar as características dessa interação que podem ter consequências na ceratite.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local de desenvolvimento do projeto

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia, Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) e Laboratório de Micologia na Faculdade de Farmácia, ambos na UFRGS.

4.2. Micro-organismos

As cepas de *Acanthamoeba castellanii* denominadas Neff (ATCC30010; de origem ambiental), T4 (ATCC50492; origem clínica) e o isolado T4 Pulmão foram usados nesse estudo. O isolado T4 Pulmão, foi obtido através da inoculação da cepa T4 em ratos e sequencial isolamento a partir do pulmão desses animais (Veríssimo *et al.*, 2013). As amebas foram mantidas em meio PYG (2% de protease peptona, 0,2% de extrato de levedo e 1,8% de glicose) suplementado com antibióticos estreptomicina e penicilina G em garrafas de cultivo (25cm²), à temperatura de 30°C. Para a realização dos experimentos, os trofozoítos que formavam a monocamada foram colhidos, centrifugados por 5min a 200x g, lavados uma vez em tampão fosfato salino (PBS) e finalmente ressuspensos em PYG ou PBS. A contagem de células foi realizada usando a câmara de contagem Fuchs – Rosenthal e a viabilidade avaliada por meio do corante de exclusão azul de tripano.

A cepa de *Fusarium solani* (FUS 13, PNCq - Programa Nacional de Controle de Qualidade) foi cultivada em tubos contendo ágar Sabouraud dextrose (Himedia) inclinados, por 2 a 3 semanas a 30°C. Para obtenção dos

conídios, PBS foi adicionado ao ágar inclinado e agitado vigorosamente. Então, a suspensão foi transferida para um tubo de centrifuga, permitindo que as hifas sedimentassem no fundo do tubo espontaneamente. Posteriormente, a fase superior da suspensão no tubo foi coletada, centrifugada (600 X g por 10min) e os conídios foram ressuspensos em PBS e contados em câmara de Neubauer. A viabilidade dos conídios foi confirmada por meio da contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) em ágar Sabouraud.

4.3. Índice de fagocitose

A avaliação da internalização dos conídios pela ameba foi determinada através do índice de fagocitose em dois intervalos de tempo (3 e 24h). Os trofozoítos foram semeados em microplacas de 96 poços em PBS e incubados por 2h a 30°C, permitindo a aclimação e a aderência de *A. castellanii* na placa. Então os conídios de *F. solani* foram adicionados aos poços, obtendo a multiplicidade de infecção 1:1 (com 10^5 células mL⁻¹ de cada um dos micro-organismos). Após 3h e 24h de incubação, a cocultura foi gentilmente ressuspensa, corada com azul de tripano e o número amebas contado em câmara de Fuchs-Rosenthal. Três poços de cada uma das cepas de ameba foram usados para determinar o índice de fagocitose, definido como o número de amebas com conídios internalizados em razão do total de amebas.

4.4. Cocultivo de *A. castellanii* e *F. solani*

4.4.1 Viabilidade fúngica

Uma suspensão amebiana contendo 2×10^5 células mL⁻¹ foi preparada em PBS. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionadas

alíquotas de 100µL dessa suspensão, e incubada a 30°C por 2h. Posteriormente 100µL da suspensão de conídios foi adicionado aos poços com as amebas (concentração final de 10^5 células mL⁻¹ de cada um dos micro-organismos) e o cocultivo incubado por 24, 48, 72, 96 e 120h. Como controle, os conídios foram incubados sozinhos em PBS. A cada intervalo de tempo, a contagem fúngica foi feita diluindo serialmente cada uma das amostras e inoculando-as em placas de ágar dextrose Sabouraud, as quais foram mantidas a 30°C por 48h para a contagem das UFCs. O experimento foi realizado em triplicata e repetido pelo menos uma vez mais.

A fim de conferir se os resultados obtidos com a contagem das UFCs foi devido à esporulação de *F. solani*, o mesmo experimento descrito anteriormente foi feito, mas ao final do tempo de incubação os conídios foram contados em câmara de Neubauer.

4.4.2 Efeito do sobrenadante da cultura e do lisado amebianos sobre o crescimento fúngico

Para a lise das amebas, a suspensão amebiana (10^5 células mL⁻¹) foi incubada sequencialmente por 1 minuto no gelo e 1 minuto a 37°C por 3 vezes. A suspensão resultante passou sete vezes por uma seringa com agulha de calibre 27G para a completa lise das amebas. Já o sobrenadante da cultura amebiana foi obtido a partir do cultivo dos trofozoítos (10^5 cells mL⁻¹) em PBS a 30°C por 72h. Após a incubação, o sobrenadante da cultura foi coletado, centrifugado (200x g por 5 min) e filtrado em membrana de 0,22µm. Então, o lisado e sobrenadante da cultura amebianos foram incubados com conídios de *F. solani* (10^5 conídios mL⁻¹) por até 120h em microplaca de 96 poços. Como

controle, o fungo foi mantido sozinho em PBS. A cada 24h, o crescimento fúngico foi avaliado por meio da contagem das UFC.

4.4.3 Viabilidade amebiana

Duzentos microlitros da suspensão amebiana em PYG (10^5 células mL^{-1}) foram adicionados à microplaca de 96 poços e incubados a 30°C por 2h antes dos tratamentos. Em seguida, os poços foram lavados 2x com PBS para retirar qualquer resíduo de PYG e as amebas foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle, com amebas sozinhas em PBS; cocultivo das amebas com conídios de *F. solani* vivos e inativados (os conídios foram inativados por aquecimento a 60°C por 3h); e incubação com o sobrenadante proveniente da cultura do fungo. Para obtenção do sobrenadante da cultura fúngica, *F. solani* foi cultivado em PBS sozinho, na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} , em placas de 6 poços por 72h. Após a incubação, o sobrenadante da cultura fúngica foi coletado, centrifugado ($600\times g$ por 10 min) e filtrado em membrana de $0,22\mu\text{m}$. Após os tratamentos, a microplaca foi incubada a 30°C por 24, 48, 72, 96 e 120h. A viabilidade amebiana foi determinada usando o ensaio de exclusão por azul de tripano ao final dos tempos de incubação. Para tanto, as amebas foram gentilmente ressuspendidas e $20\mu\text{L}$ da solução de azul de tripano a 0,4% foram adicionados aos poços. A suspensão amebiana, então, foi contada em câmara de Fuchs-Rosenthal. O experimento foi feito em triplicata, com pelo menos uma repetição.

4.5. Influência de *F. solani* no processo de encistamento de *A. castellanii*

Trofozoítos (10^5 células mL^{-1}) foram semeados em placas de cultivo de 24 poços usando tampão Tris como indutor de encistamento (Koehsler *et al.*, 2008). Após 30 min de aclimação, as amebas foram incubadas com conídios de *F. solani* na proporção de 1:1 a 30°C por 96h. Como controle, as amebas permaneceram sozinhas em meio de encistamento. Ao final do tempo de incubação, o número de trofozoítos e cistos foram determinados em câmara de contagem Fuchs-Rosenthal. Os dados foram expressos como percentagem de encistamento, isto é, o número de cistos em razão do número total de amebas. O experimento foi realizado em triplicata e repetido uma vez.

4.6. Perfil de suscetibilidade aos antiamebianos

Para verificar o quanto *F. solani* pode interferir na resistência de *A. castellanii* a agentes antiamebianos foi realizado ensaio de atividade amebicida com a ameba antes e após o cultivo com o sobrenadante da cultura do fungo. Inicialmente *A. castellanii* foi cultivada com o sobrenadante proveniente da cultura fúngica por 72h a 30°C em garrafas de cultivo (25cm^2), para obtenção de maior rendimento de células. Como controle, as amebas foram cultivadas nas mesmas condições, mas em PBS. Ao término da incubação, o conteúdo do cultivo foi centrifugado ($200\times g$, 5 min) e ressuscitado em PYG. As amebas foram contadas usando o corante azul de tripano e a suspensão celular foi ajustada para a concentração 10^5 amebas vivas mL^{-1} . Em seguida, 100 μL dessa suspensão e 100 μL de solução de clorexidina foram inoculados nos poços de uma microplaca de 96 poços. As concentrações finais testadas foram 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 e 0,78125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de clorexidina, diluídas em água bidestilada estéril a partir de uma solução estoque a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após

24h de incubação a 30°C, as células viáveis foram contadas em câmara de Fuchs-Rosenthal utilizando o corante azul de tripano. Como controle negativo foi utilizado água bidestilada estéril, o qual foi considerado com 100% de amebas viáveis. O cálculo do percentual de viabilidade nos demais tratamentos foi em razão do controle.

4.7. Efeito citopático de *F. solani* contra células VERO

O efeito citopático de *F. solani* sobre células VERO (linhagem de células epiteliais renais de macaco verde africano, ATCC CCL-81), antes e após a passagem pelas cepas de amebas, foi avaliado pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo), modificado de Mosmann (1983). Inicialmente os conídios foram obtidos a partir do cocultivo de *F. solani* e *A. castellanii* por 5 dias (nas mesmas condições descritas anteriormente) em placas de 6 poços para maior rendimento. Todo o conteúdo da cocultura foi transferido para tubos de 15mL, permitindo que as hifas e as amebas assentassem espontaneamente no fundo do tubo. Em seguida a fase superior com os conídios foi recolhida, centrifugada (600x g por 10min), lavada e os conídios foram ressuspensos em PBS e contados em câmara de Neubauer. *F. solani* sem ter entrado em contato com as amebas foi submetido ao mesmo procedimento, e esses conídios foram considerados como *F. solani* antes de ter passado pela ameba. Essas suspensões fúngicas foram armazenadas a 4°C até o momento de testá-las contra as células VERO. As células VERO foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 100 U mL⁻¹ de penicilina G e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina (GIBCO) a 37 °C e 5%

CO₂. As células VERO foram semeadas (2×10^5 células mL⁻¹) em microplacas de 96 poços e incubadas por 24h para formar monocamadas confluentes. Então as células VERO foram expostas aos conídios de *F. solani*. Para tanto, o meio de cultivo foi descartado, e 200µL de uma suspensão contendo 0.5×10^5 conídios mL⁻¹ de *F. solani* em DMEM foram adicionados. Então a microplaca foi incubada por mais 24h a 37°C. Poços com somente células VERO foram utilizados como controle. Após 24h, 30 µL de solução de MTT (3 mg mL⁻¹; Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) foi adicionado a cada poço. A microplaca foi incubada por mais 4h, após as quais, o meio com MTT não transformado foi recolhido e 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma) foram adicionados aos poços, para a solubilização dos cristais de formazan, e a microplaca incubada por 30 min. Em seguida a absorbância foi mensurada em um leitor de microplacas (Benchmark BioRad) com comprimento de onda 570nm com filtro de referência de 620nm. O percentual de mortalidade foi calculado como $([A_T/A_C]-1) \times 100$, em que A_T corresponde à absorbância das células expostas a *F. solani* e A_C a media da absorbância das células não tratadas.

4.8. Análise Estatística

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Todas as análises foram feitas usando o programa SPSS, definindo a significância estatística com $p < 0,05$. As diferenças entre as médias nos experimentos de viabilidade amebiana e fúngica foram determinadas pela análise da variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo pós- teste de Bonferroni. Para os ensaios de índice de fagocitose e perfil de susceptibilidade foram usados ANOVA de

uma via, seguidos do teste de Tukey. Já a significância do efeito citopático foi analisada por meio de ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett. A comparação entre as médias no processo de encistamento foi avaliada por meio do teste t de Student.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse estudo representa a primeira caracterização da interação entre *F. solani* e *A. castellanii*, ambos gêneros implicados em ceratite relacionada a lentes de contato. Embora raro, casos de co-infecção com amebas de vida livre e fungos filamentosos já foram reportados na literatura médica. Para entender como *A. castellanii* e *F. solani* podem afetar o comportamento reciprocamente, o cocultivo foi realizado em PBS. Essa solução não possui nutrientes, dessa forma, qualquer crescimento microbiano observado no cocultivo é resultante da real interação entre os dois organismos e não devido a algum fator externo que promova o crescimento. Além disso, foi avaliado como a interação ameba-fungo pode afetar características intrínsecas de ambos micro-organismos.

5.1. Fagocitose de *F. solani* pelas cepas de *A. castellanii*

Inicialmente foi avaliada a capacidade de fagocitose dos conídios de *F. solani* por *A. castellanii*. Após 3h de cocultivo as cepas e o isolado de *A. castellanii* apresentaram conídios internalizados, sendo o índice de fagocitose do isolado T4 pulmão três vezes superior ao das outras cepas amebianas ($p < 0,05$; Tabela 1). Dentre as amebas contendo conídios, cerca de 83% (± 24) eram viáveis. Em 24h de cocultivo, o índice de fagocitose do isolado T4 pulmão permaneceu superior quando comparado a T4 (origem clínica), mas sem diferença estatística em relação à cepa Neff (origem ambiental). A viabilidade da cepa Neff foi de 96% (± 5) dentre as amebas com conídios internalizados. Entretanto, a cepa T4 e o isolado T4 pulmão apresentaram viabilidade de 58% (± 17) e 55% (± 4), respectivamente. Khan (2004) sugere que a fagocitose é

uma propriedade de virulência importante em *Acanthamoeba* spp., já que a ligação da ameba às células hospedeiras estimula processos secundários, tais como a fagocitose. Isso pode explicar o motivo pelo qual o isolado T4 pulmão apresentou o maior índice de fagocitose, já que essa cepa recentemente passou por um modelo animal e algumas características de virulência podem ter sido ativadas. Veríssimo *et al.* (2013) demonstrou que o decréscimo de virulência de *Acanthamoeba* observado em cultura axênica prolongada pode ser restaurado por meio da passagem da ameba em modelo animal.

Tabela 1. Fagocitose de *F. solani* pelas cepas T4 e Neff, e isolado T4 pulmão de *A. castellanii*. O índice de fagocitose foi calculado por meio da contagem do número de amebas com conídios internalizados em razão do número total de amebas. Os resultados representam a média e o desvio padrão de cada cepa em triplicata. Asterisco e sustenido indicam variação significativa entre as três cepas em cada tempo ($p < 0,05$).

	Índice de fagocitose (%)	
	3h	24h
Ameba T4	5.2 ± 0.5	5.5 ± 0.6#
Ameba T4 pulmão	15.2 ± 5.2*	9.4 ± 1.6*
Ameba Neff	5.6 ± 1.3	7.6 ± 0.5*#

5.2. Viabilidade fúngica em cocultivo com *A. castellanii*

As cepas Neff e T4 e o isolado T4 pulmão de *A. castellanii* testados induziram o aumento do número de conídios, que teve início entre o segundo e o terceiro dia de cocultivo (Figura 1A), e isso reflete no aumento da contagem das UFCs (Figura 1B), quando comparado ao crescimento fúngico sem a ameba ($p < 0,05$). A presença da ameba T4 pulmão induziu uma menor

contagem de esporos de *F. solani* a partir de 72h quando comparado ao efeito induzido pelas cepas Neff e T4, mas essa diferença significativa foi perceptível na contagem da UFC somente em 120h de cocultivo. Justamente a ameba T4 pulmão foi a que apresentou maior índice de fagocitose. Talvez o processo de fagocitose prejudique a formação de conídios ou os inviabilize e por isso uma menor contagem de esporos ocorra com o isolado T4 pulmão. A diferença de magnitude observada entre a contagem de esporos e de UFCs pode ser devido às metodologias distintas usadas para a determinação do crescimento fúngico, cada uma das quais com seus erros inerentes.

Através da observação microscópica do cocultivo e da quantificação do crescimento fúngico foi possível observar que os conídios de *F. solani* germinaram formando hifas, na presença das amebas e sozinhos em PBS. Entretanto, após 24h, *F. solani* praticamente parou de crescer quando em PBS sozinho, enquanto que em cocultura com a ameba continuou a formar hifas e principalmente conídios. Essa ausência ou baixo crescimento de *F. solani* na condição controle pode ser resultante do consumo de reservas nutricionais dos conídios, que acabam sendo exauridas após 24h. Curiosamente, alguns conídios foram capazes de germinar dentro da ameba, observados através de microscópio óptico (Figura 2). Resultados anteriormente publicados com microorganismos de ambientes internos demonstraram que os fungos *Aspergillus versicolor* e *Penicillium spinulosum* se beneficiaram da presença de *A. polyphaga*, o que não ocorreu com *Stachybotrys chartarum* (Yli-Pirilä *et al.*, 2006). Os autores sugeriram que possivelmente os fungos foram capazes de utilizar subprodutos liberados pelo crescimento ou lise das amebas.

Steenbergen *et al.* (2004) demonstraram a capacidade de fungos dimórficos em matar *A. castellanii* e usá-la como fonte de nutrientes para o crescimento fúngico. Enquanto *Blastomyces dermatitidis* exerceu efeito citotóxico extracelular sobre a ameba, *Sporothrix schenckii* e *Histoplasma capsulatum* utilizaram a ameba após serem fagocitados.

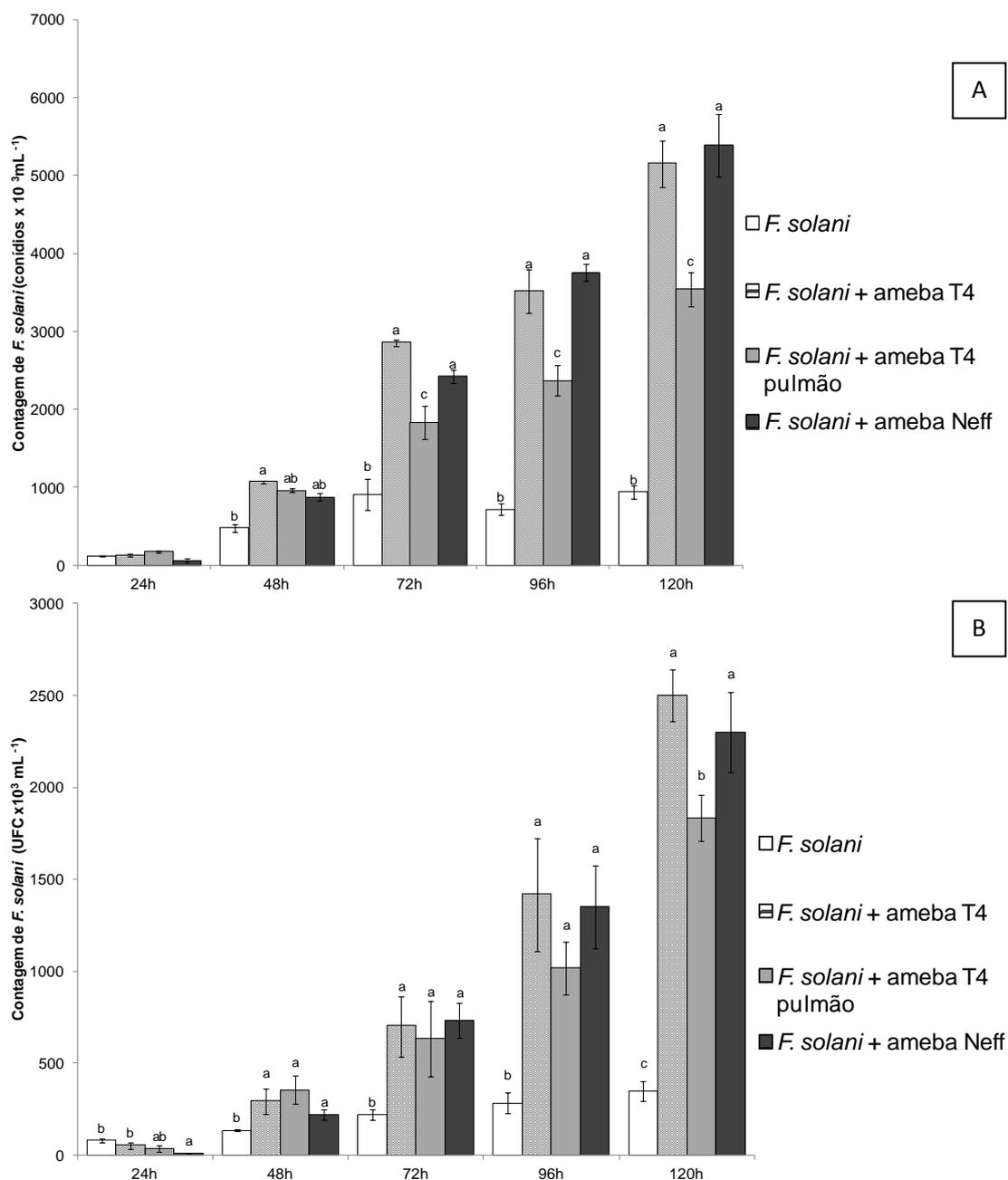


Figura 1. Cocultivo de *F. solani* com *A. castellanii* – cepa T4 (barras listradas), isolado T4 pulmão (barras cinza) e cepa Neff (barras cinza escuro) – e sozinho em PBS (barras brancas). Crescimento de *F. solani* avaliado pela (A) contagem de conídios e (B) UFC. Letras em minúsculo indicam variação significativa ($p < 0.05$). Cada barra representa a média das amostras em triplicata e a barra de erro, o desvio padrão.

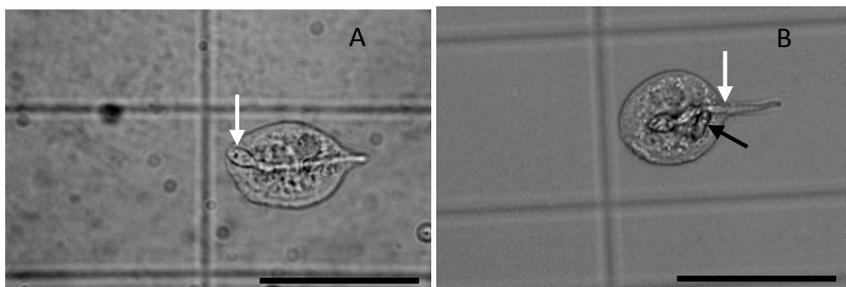
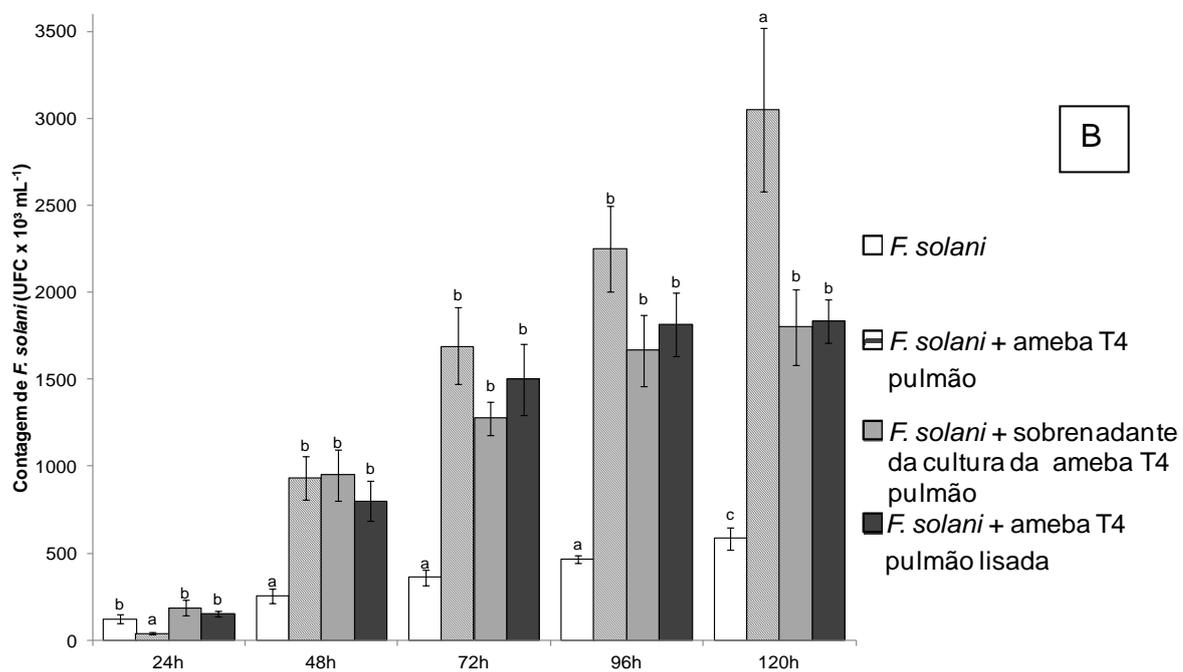
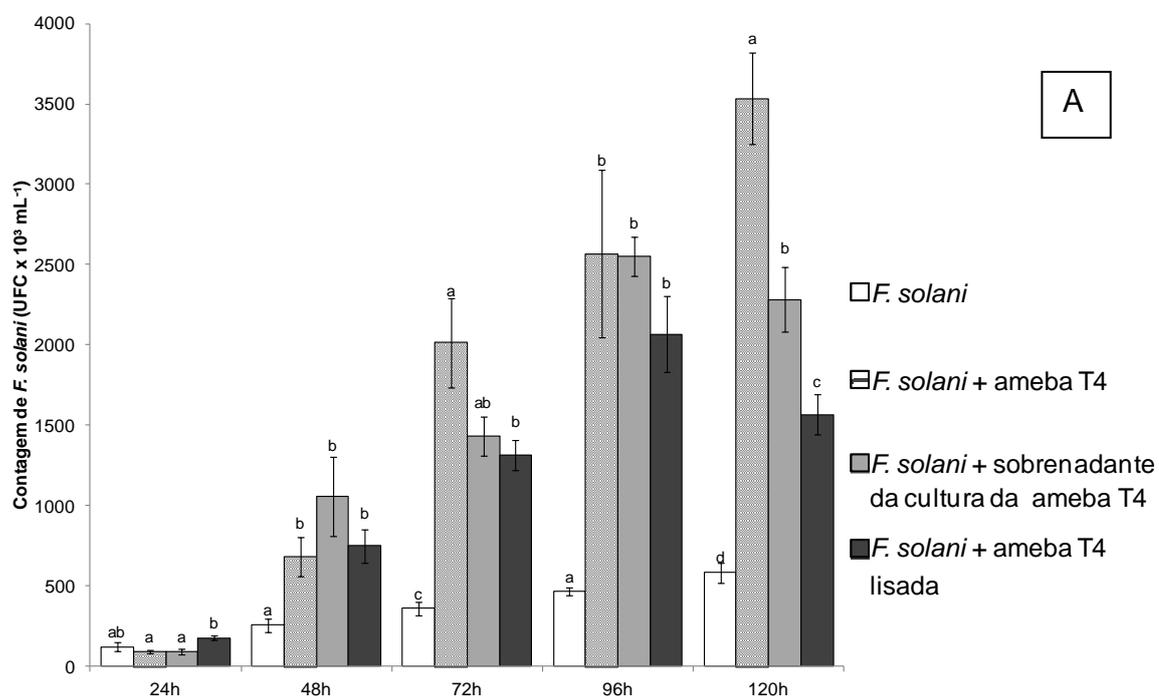


Figura 2. Observação por meio de microscopia óptica de um trofozoíto de *A. castellanii* com conídio de *F. solani* internalizado. O trofozoíto possui um conídio germinado (A) a hifa recém formada começa a sair da ameba (setas em branco). Observa-se, na figura B, que o trofozoíto também apresenta um conídio não germinado (seta em preto). O traço corresponde a 50 μ m.

Para compreender se o crescimento massivo de *F. solani* em cocultura com *A. castellanii*, foi devido à ameba viva ou a alguma secreção celular, analisou-se o efeito do sobrenadante da cultura e do lisado amebiano sobre o crescimento do fungo. Os resultados demonstraram que não somente a ameba viva, como também o sobrenadante da cultura e o lisado amebianos aumentaram o crescimento de *F. solani* quando comparado ao fungo em PBS ($p < 0,05$; Figura 3). O sobrenadante e o lisado provenientes das amebas T4 e T4 pulmão intensificaram o crescimento de *F. solani*, de maneira similar ao efeito produzido pelas amebas vivas. Entretanto, em 120h de incubação, as amebas T4 e T4 pulmão vivas induziram maior crescimento do fungo em comparação ao lisado e ao sobrenadante dessas mesmas amebas (Figura 3A e B, respectivamente). A ameba lisada parece induzir a esporulação de forma mais moderada quando comparada à ameba viva; porém a diferença de crescimento fúngico somente foi significativa em 72h e 120h de incubação na presença da ameba T4 lisada e em 120h na presença ameba T4 pulmão lisada ($p < 0,05$; Figura 3A e 3B, respectivamente). No entanto, o comportamento de *F.*

solani na presença do sobrenadante da cultura e do lisado oriundos da cepa Neff foi diferente (Figura 3C). O lisado amebiano induziu um crescimento massivo de *F. solani* em comparação às condições em que o fungo estava sozinho em PBS ou na presença da ameba viva ($p < 0,05$), exceto em 120h de incubação, na qual não houve diferença significativa entre ameba viva e lisada. O sobrenadante da cultura da ameba Neff resultou em maior contagem de UFC, em relação a *F. solani* cocultivado com a ameba viva. Essa interação ameba-fungo parece ser dependente da cepa amebiana ou da sua origem, uma vez que a cepa de origem ambiental (Neff) causou maior esporulação quando lisada, enquanto a cepa clínica (T4) e o isolado de origem animal (T4 pulmão) pareceram induzir maior esporulação quando o fungo foi exposto à ameba viva. Esses resultados sugerem uma multiplicidade de interações entre *A. castellanii* e *F. solani*, já que a ameba em si pode servir como fonte nutricional e até mesmo, secretar algum fator promotor de crescimento ou nutrientes, que por sua vez, podem ser usados para o crescimento do fungo. Corroborando essa hipótese, resultados semelhantes foram obtidos com as bactérias *Mycobacterium smegmatis* e *Acinetobacter baumannii*. Os detritos celulares e o sobrenadante resultantes da lise de *A. polyphaga* também aumentaram significativamente o crescimento de *M. smegmatis* (Lamrabet et al., 2012). Os sobrenadantes das culturas de *A. culbertsoni* e *A. castellanii* elevaram a contagem de *A. baumannii* (Cateau et al., 2011). Em um estudo em que *Salmonella enterica* Sorovar Typhi e *A. castellanii* foram cocultivadas em câmaras separadas por uma membrana que permite somente a transferência de nutrientes, mas não associação física, foi observada uma sobrevivência

maior da bactéria, do que quando não estava associada a *A. castellanii* (Douesnard-Malo & Daigle, 2011). Os autores sugerem que a persistência de bactérias no ambiente pode ser favorecida por amebas que fornecem nutrientes derivados de amebas mortas. Esse efeito não é limitado às bactérias, a presença do sobrenadante da cultura de *Hartmanella vermiformis* e *A. castellanii* também aumentaram o crescimento da levedura *Exophiala dermatitidis* (Cateau *et al.*, 2009). Em um estudo similar, o sobrenadante de *H. vermiformis* propiciou uma maior sobrevivência de *Candida albicans*, mas não aumentou o seu crescimento. Provavelmente os sobrenadantes continham restos celulares da ameba, que podem ter sido utilizados como nutriente aumentando a sobrevivência das leveduras, mas não o seu crescimento, visto que, a proliferação de *C. albicans* ocorreu somente após a internalização da levedura pela ameba (Vanessa *et al.*, 2012). Cateau e colaboradores (2014) demonstraram que o sobrenadante da cultura de *H. vermiformis* e *A. castellanii* aumentou o crescimento de *Fusarium oxysporum*, possivelmente devido à produção de metabólitos pelo protozoário. Mais ainda, a presença desses sobrenadantes resultou em maior percentual de germinação dos conídios. Os trabalhos anteriormente publicados com fungos avaliaram a interação de amebas de vida livre, vivas ou do seu sobrenadante, sendo o presente estudo o primeiro a caracterizar a interação entre fungo e ameba lisada. Os resultados sugerem que a interação de *F. solani* é dependente da cepa amebiana, já que a máxima esporulação de *F. solani* foi obtida na presença do lisado da ameba Neff, enquanto a cepa T4 e o isolado T4 pulmão tendem a resultar em maior esporulação quando cocultivadas vivas com o fungo.



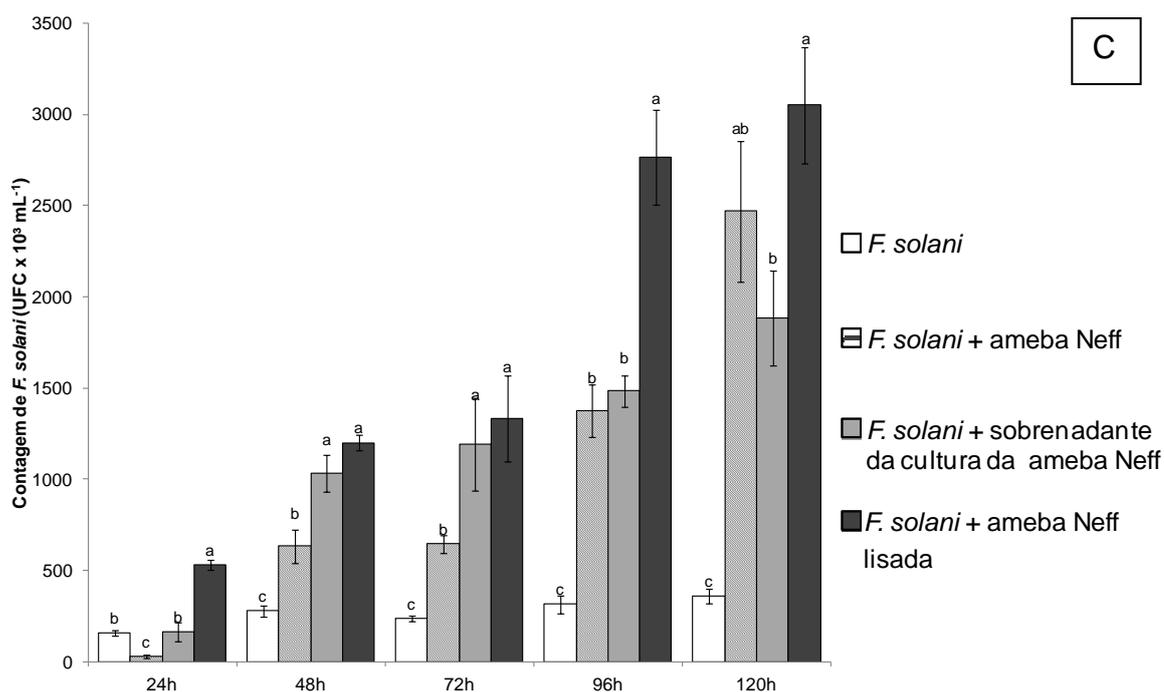


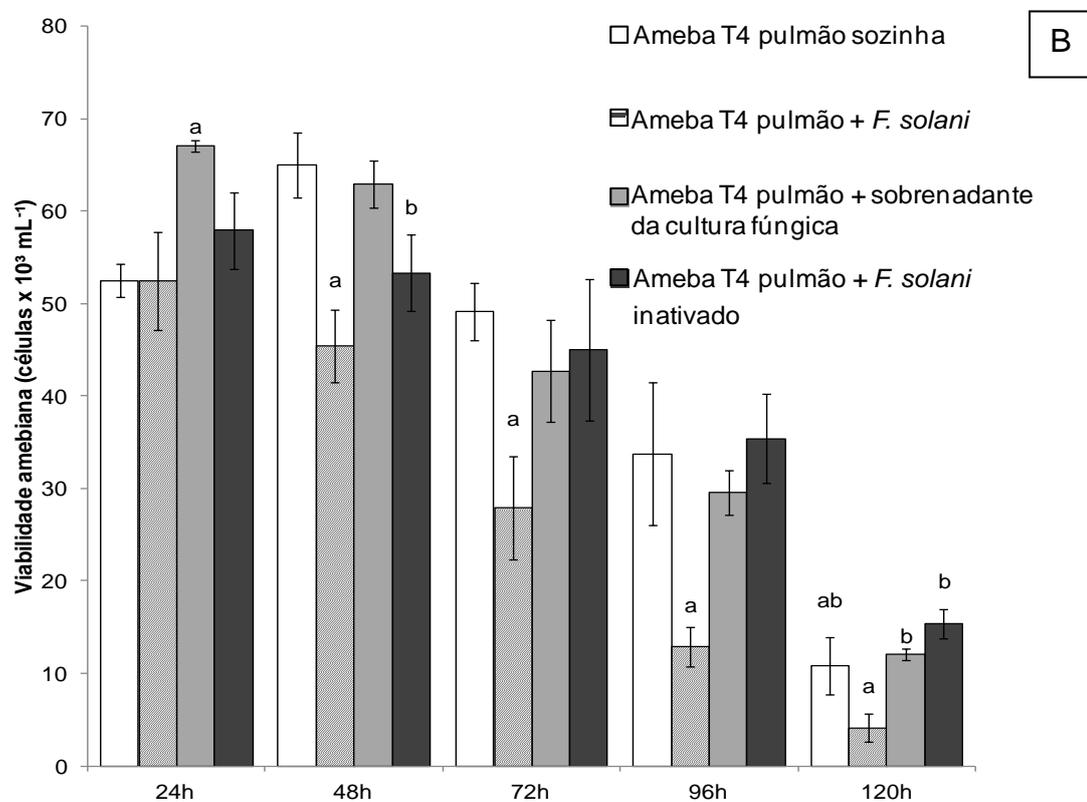
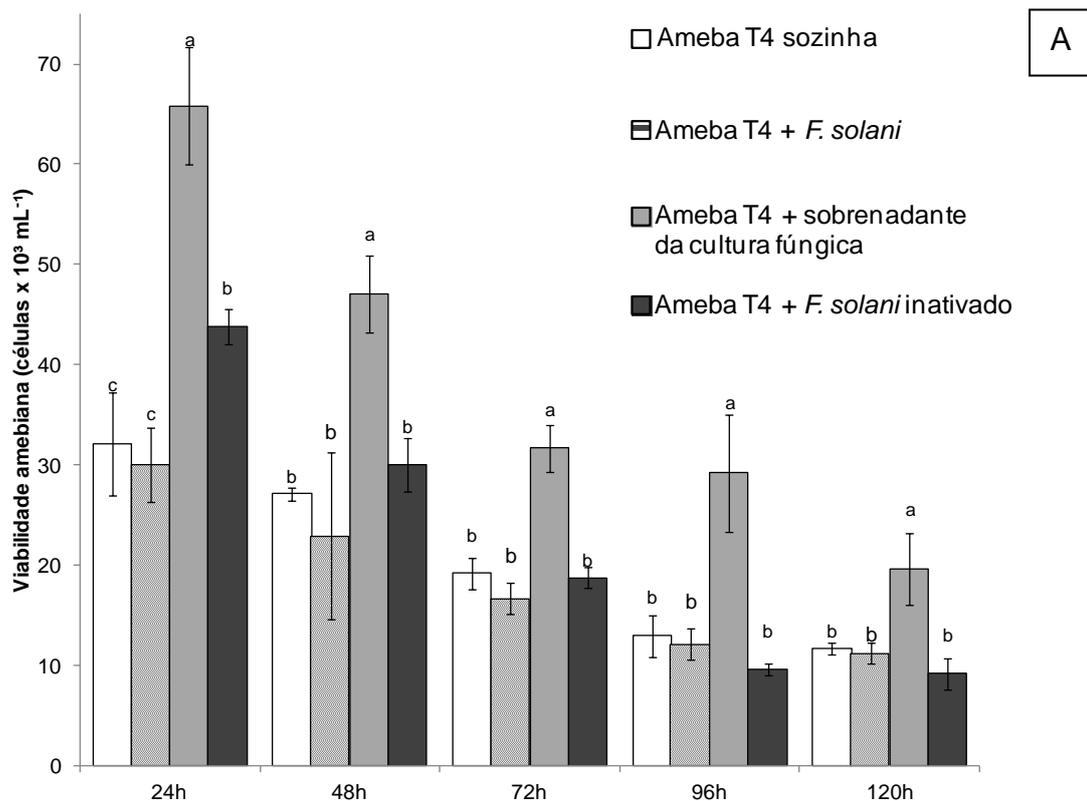
Figura 3. Crescimento de *F. solani* com *A. castellanii* viva (barras listradas), sobrenadante da cultura amebiana (barras cinza), ameba lisada (barras cinza escuro) e sozinho em PBS (barras brancas). As amebas testadas foram: (A) T4, (B) T4 pulmão e (C) Neff. Letras em minúsculo indicam variação significativa ($p < 0.05$). Cada barra representa a média das amostras em triplicata e a barra de erro, o desvio padrão.

5.3. Viabilidade amebiana em cocultivo com *F. solani*

A fim de avaliar o comportamento de *A. castellanii* quando cultivada com *F. solani* — vivo e inativado — e com o sobrenadante da cultura fúngica, foi utilizado o ensaio de exclusão por azul de tripano para determinar a viabilidade da ameba. Independentemente da cepa de *A. castellanii* e o tratamento ao qual foi submetida, observou-se um declínio da viabilidade ao longo do tempo de incubação (Figura 4). Não houve diferença nas contagens de *A. castellanii* T4 viáveis quando cocultivada com o fungo vivo e inativado, e o controle, exceto em 24h de incubação (Figura 4A). Nesse período, a viabilidade da ameba foi maior na presença dos conídios inativados, em

relação ao controle e ao fungo vivo ($p < 0,05$). Em relação ao isolado T4 pulmão, o fungo vivo resultou em menor viabilidade da ameba entre 48h e 96h e o fungo inativado diminuiu-a em 48h de incubação (versus o controle; Figura 4B). Já, o fungo vivo, proporcionou uma maior sobrevivência da cepa Neff comparada às situações em que a ameba estava sozinha em PBS, em 72h e 96h de incubação ($p < 0,05$; figura 4C). Enquanto a presença do sobrenadante da cultura fúngica propiciou uma maior resistência à diminuição da viabilidade, comparado ao controle, em todo o período analisado, a viabilidade da cepa Neff e do isolado T4 pulmão foram afetadas positivamente pelo sobrenadante fúngico somente em alguns tempos de incubação, 120h e 24h respectivamente. A viabilidade amebiana observada na presença de *F.solani* vivo pode ter sido subestimada, pois as hifas, principalmente após 72h de incubação, prejudicaram a contagem das amebas. Assim, viabilidade amebiana talvez fosse superior na presença do fungo, o que pode não ter sido detectado em alguns momentos devido às limitações da técnica. As diferentes respostas de *A. castellanii* frente ao fungo vivo e inativado, bem como ao sobrenadante fúngico, podem ser devido às características fisiológicas intrínsecas de cada cepa e isolado amebianos. Por exemplo, o isolado T4 pulmão apresenta taxas de crescimento mais acelerados em relação às cepas Neff e T4 (dados não mostrados), e talvez por isso a sua sobrevivência praticamente não foi afetada pelo sobrenadante fúngico, pois possivelmente a carga de nutrientes ou fatores de crescimento providos pelo sobrenadante é baixa, não suportando as taxas de crescimento desse isolado. Além disso, a baixa sobrevivência do isolado T4 pulmão na presença do fungo vivo, pode ser

devida ao processo de fagocitose. Esse isolado apresentou maior índice de fagocitose (Tabela 1), embora não se tenha feito nenhum teste estatístico comparando a viabilidade das amebas com conídios internalizados e sem conídios, é possível concluir que a germinação dos conídios dentro da ameba, ou mesmo a exocitose do fungo, pode afetar a viabilidade amebiana. Portanto quanto maior o número de amebas com conídios internalizados, menor a viabilidade.



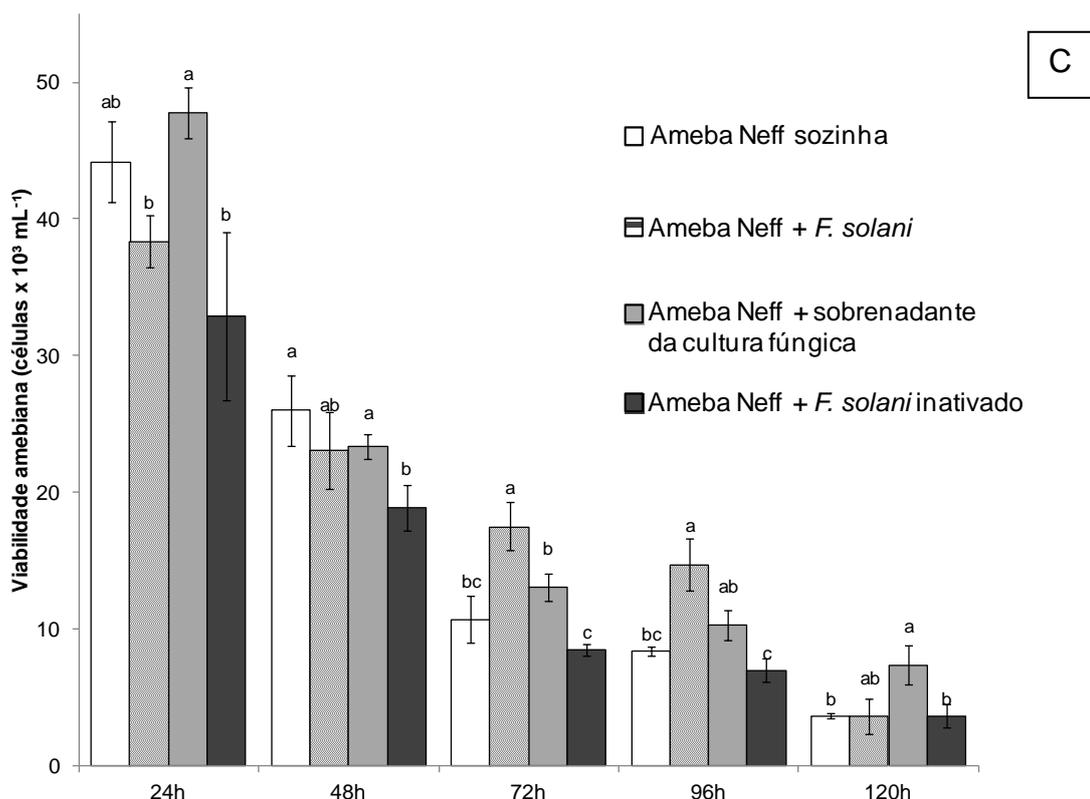


Figura 4. Viabilidade amebiana cultivada com *F. solani* vivo (barras listradas), sobrenadante da cultura fúngica (barras cinza), fungo inativado (barras cinza escuro) e ameba sozinha em PBS (barras brancas). As amebas testadas foram: (A) T4, (B) T4 pulmão e (C) Neff. Letras em minúsculo indicam variação significativa ($p < 0.05$). Cada barra representa a média das amostras em triplicata e a barra de erro, o desvio padrão.

Diferentemente de estudos anteriores, em que o fungo induz a morte da ameba, ou simplesmente não afetam a sobrevivência amebiana (Steenbergen *et al.*, 2004; Yli-Pirilä *et al.*, 2006; Van Waeyenberghe *et al.*, 2013; Cateau *et al.*, 2014), os resultados do presente estudo indicam que a interação entre *A. castellanii* e *F. solani* pode ser benéfica para a ameba. Entretanto a ausência de crescimento das cepas T4 e Neff na presença de *F. solani* vivo e inativado, sugere que *A. castellanii* não utiliza o fungo como fonte de alimento. A presença de *F. solani* vivo e do sobrenadante da sua cultura simplesmente retardam a mortalidade da ameba, induzida por uma situação de

escassez, já que a solução de cultivo não possui nutrientes. Ainda assim, esses resultados podem ter significância biológica, pois *F. solani* potencialmente auxiliaria a persistência da ameba em ambientes com poucos recursos nutricionais. Esses dados contradizem a proposição de Lin *et al.* (2009), segundo a qual, em infecções mistas, *Acanthamoeba* pode progredir rapidamente pois o fungo pode servir como fonte de alimento para a ameba. O mais provável é que a ameba sirva de fonte de alimento para o fungo, não o oposto. Entretanto, outros micro-organismos podem ser usados como alimento pela ameba. Estudos com estojos de lentes de contato demonstram que *Acanthamoeba* spp. têm sido coisolada com bactérias e fungos, os quais podem ter uma relação com a sobrevivência da ameba (Larkin *et al.*, 1990; Devonshire *et al.*, 1993; Gray *et al.*, 1995; Pens *et al.*, 1998). É sugerido que a contaminação de sistemas de lentes de contato com *Acanthamoeba* spp. e bactérias capazes de suportar o crescimento amebiano pode ser a primeira etapa na patogênese da ceratite amebiana por proporcionar grandes inóculos de ameba (Bottone *et al.*, 1992). Entretanto os resultados obtidos *in vitro* podem não corresponder à realidade *in vivo*, assim estudos com coinfeção de *Fusarium* spp. e *Acanthamoeba* spp. são necessários para elucidar essa interação.

5.4. Influência de *F. solani* no processo de encistamento de *A. castellanii*

Como o maior desafio no manejo de ceratite por *Acanthamoeba* é a erradicação eficaz dos cistos, a próxima etapa foi avaliar o efeito de *F. solani* no encistamento de *A. castellanii*. Quando cocultivado com a cepa T4 e isolado

T4 pulmão, *F. solani* aumentou significativamente o percentual de amebas encistadas, em comparação à ameba sozinha na solução de encistamento ($p < 0,05$; Figura 5). No entanto, o fungo não afetou o número de cistos da cepa Neff. Visto que os cistos são altamente resistentes a tratamentos com agentes biocidas e são capazes de sobreviver em condições adversas, eles podem persistir no estroma da córnea ao longo do tratamento da ceratite. Quando as condições se tornam novamente favoráveis, a ameba pode desencistar, com o retorno da infecção robusta (Panjwani, 2010). Dessa forma, o favorecimento da formação de cistos por *F. solani* é bastante preocupante, pois podem acarretar na persistência da ameba no sítio de infecção, principalmente quando se considera que casos de coinfeção já foram relatados.

Quando confrontada a condições adversas, *Acanthamoeba* spp. pode mudar o seu fenótipo, formando cistos. Essa habilidade de diferenciação recíproca de trofozoíto a cisto é conhecida como mudança fenotípica, a qual pode representar a habilidade de *Acanthamoeba* spp. em alternar a expressão de proteínas e glicoproteínas de superfície, que por sua vez, podem auxiliar a ameba a evadir o sistema imune (Khan, 2004). Da Rocha-Azevedo e Silva-Filho (2007) observaram que o isolado clínico de *A. polyghaga* foi capaz de se transformar em cisto e trofozoítos mais rápido que o isolado de água doce. Aqui, a cepa T4 e o isolado T4 pulmão, de origem clínica e reisolado de pulmão de rato respectivamente, apresentaram maior percentual de encistamento na presença de *F. solani*. Assim, o fungo, possivelmente um agente estressor, pode ter exacerbado uma característica pré-existente de mudança fenotípica dessas amebas. Curiosamente, o isolado T4 pulmão, que recentemente foi

desafiado pelo sistema imune de rato, foi o que apresentou maior percentual de cistos. Já a cepa Neff, de origem ambiental, não alterou a formação de cistos na presença de *F. solani*. Possivelmente essa cepa possui uma menor habilidade em mudar de fenótipo, e talvez menor virulência, e por isso não responde, ou responde mais lentamente, a fatores de estresse adicionais. Desse modo, pode existir uma correlação entre virulência e mudança fenotípica em *Acanthamoeba* spp., visto que a cepa T4 e o isolado T4 pulmão, provavelmente mais virulentos que a cepa Neff, apresentaram maior índice de encistamento. No entanto foi proposto, que a virulência pode estar relacionada a características fisiológicas distintas das cepas e não a uma dependência das condições ambientais (Walochnik *et al.*, 2000). Isso implica que a origem da cepa não é determinante para a expressão de características de virulência, isto é, cepas de origem ambiental também podem apresentar características adaptativas que conferem algum grau de virulência frente a hospedeiros mamíferos, mas podem ainda não ter encontrado a oportunidade de infectá-los. Como *Acanthamoeba* spp é anfizóica e um patógeno oportunista, virtualmente todos os isolados ambientais potencialmente podem ser virulentos.

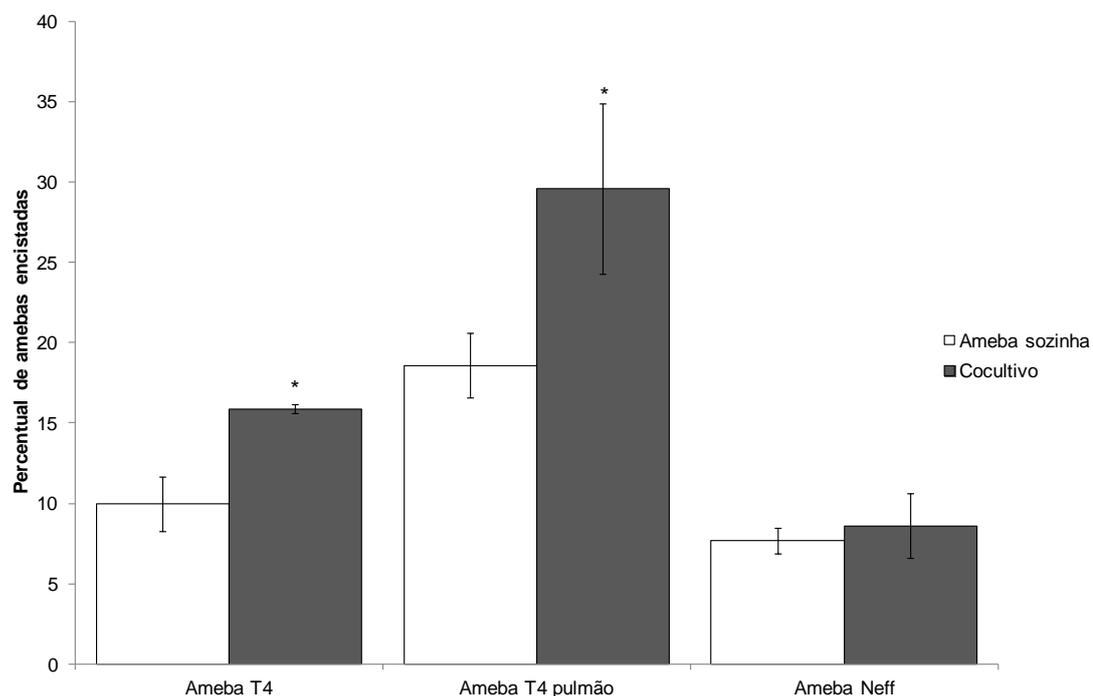


Figura 5. Influência de *F. solani* no processo de encistamento. A Percentagem de cistos das cepas e do isolado de *A. castellanii* foi determinada na presença e na ausência do fungo. O número de cistos e trofozoítos foram contados em três poços para cada uma das condições. Asterisco representa variação significativa ($p < 0,05$).

5.5. Perfil de suscetibilidade a antiamebiano

A virulência de micro-organismos pode ser afetada pela interação com *Acanthamoeba* spp., o contrário é menos óbvio. Um dos exemplos mais evidentes é a interação *Acanthamoeba* - *Legionella pneumophila*, em que bactérias crescidas no interior da ameba exibiram um aumento de virulência, motilidade e resistência a biocidas, em comparação ao crescimento bacteriano em meio axênico (Greub & Raoult, 2002). Dessa forma, um dos objetivos do presente estudo foi avaliar se a interação de *F. solani* com *A. castellanii* pode interferir na suscetibilidade da ameba a agentes biocidas. O ensaio foi realizado com clorexidina, por se tratar de um antimicrobiano usado no tratamento de ceratite por *Acanthamoeba* (Karsten *et al.*, 2012). A ameba T4

previamente cultivada com o sobrenadante da cultura fúngica não apresentou diferença de sensibilidade a clorexidina quando comparada a ameba cultivada em PBS (Figura 6A). Entretanto, após a exposição ao sobrenadante fúngico por 72h, a cepa Neff apresentou um perfil diferente de suscetibilidade ao agente microbiano. Nas concentrações de 1,5625 e 3,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de clorexidina, essa cepa mostrou-se mais resistente, ou seja, a ameba apresentou maior taxa de sobrevivência nessas concentrações quando comparada a ameba mantida em PBS ($p < 0,01$; Figura 6B). Assim, provavelmente o fungo pode afetar a susceptibilidade da ameba ao antimicrobiano, pelo menos parcialmente. Curiosamente, esse efeito independe de contato celular, já que a ameba foi exposta ao sobrenadante da cultura fúngica livre de células, sugerindo a participação de algum metabólito secretado pelo fungo. Como as amebas de vida livre oriundas de ceratite podem conter bactérias internalizadas, especula-se um possível papel dessas bactérias intracelulares na resistência a biocidas ou na patogenicidade da ameba (Thomas *et al.*, 2010). Um dos poucos trabalhos que abordam esse aspecto, foi o proposto por Cengiz *et al.* (2000), que demonstrou o aumento da sobrevivência de *A. castellanii* quando co-incubada com *Pseudomonas aeruginosa* frente a diferentes soluções de limpeza de lentes de contato, possivelmente por usar a bactéria como fonte nutricional.

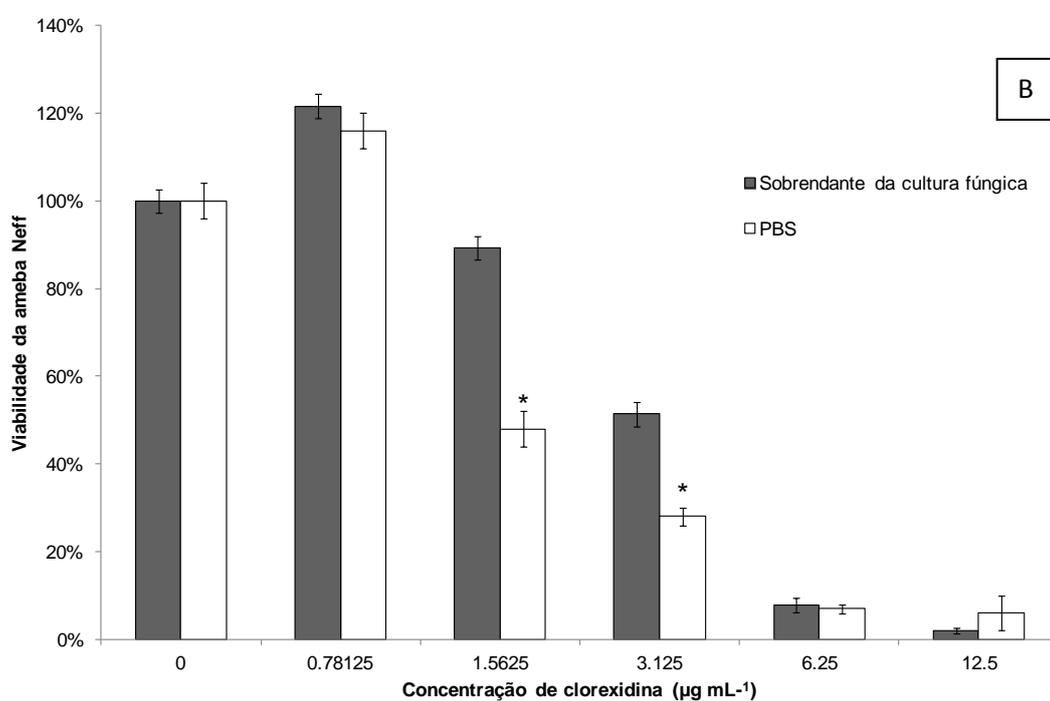
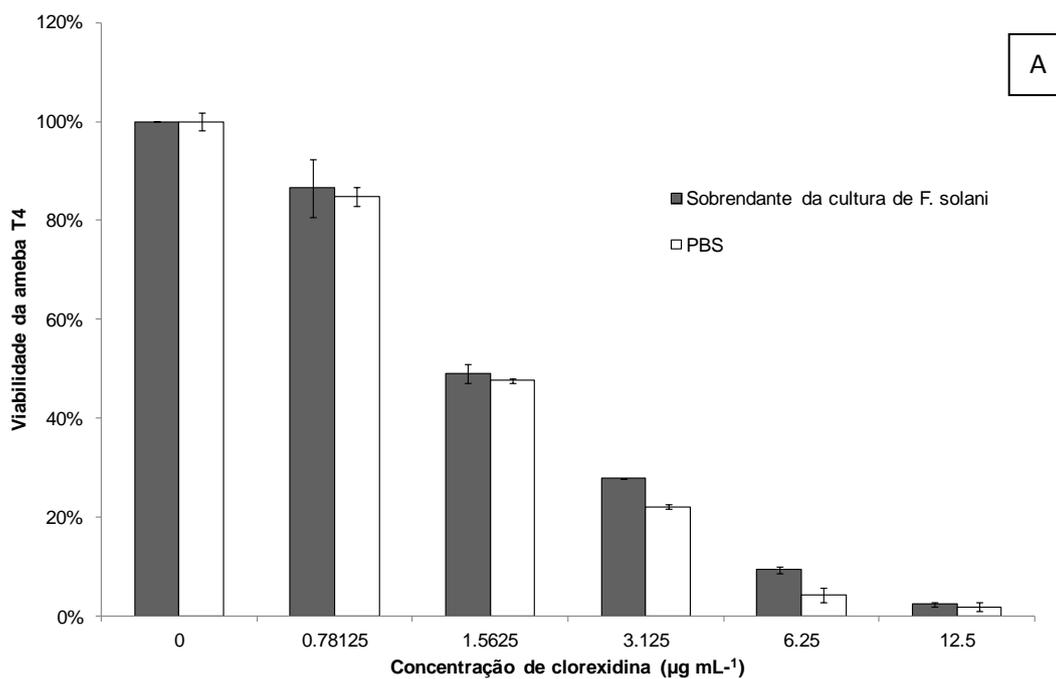


Figura 6: Perfil de suscetibilidade de *A. castellanii* a clorexidina após cultivo com o sobrenadante da cultura fúngica (barras cinza) ou com PBS (barras brancas). Foram testadas duas cepas amebianas: (A) T4 e (B) Neff. Cada uma das condições foi realizada em duplicata. Asterisco representa variação significativa ($p < 0,01$).

5.6. Efeito citopático de *F. solani* sobre células VERO

Amebas de vida livre têm sido implicadas no aumento de efeitos adversos em bactérias em uma variedade de formas. Por exemplo, a cocultura com ameba aumenta: a sobrevivência e a replicação de *Legionella pneumophila* em monócitos, a habilidade em invadir macrófagos e a virulência de *Mycobacterium* spp. contra macrófagos humanos (Cirillo *et al.*, 1997; Cirillo *et al.*, 1994; Cirillo *et al.*, 1999). Portanto, com o objetivo de verificar se a interação entre *A. castellanii* e *F. solani* pode afetar a virulência do fungo foi avaliado o efeito citopático *F. solani* isoladamente sobre células VERO, antes e após o contato do fungo com as cepas amebianas. O contato prévio de *F. solani* com a cepa Neff acarretou em aumento do efeito citopático sobre células VERO ($p < 0,05$; Figura 7), ou seja, o fungo aumentou a sua capacidade de matar células de mamíferos, em comparação com *F. solani* que não teve qualquer exposição à ameba. Contudo, o contato com a cepa T4 e o isolado T4 pulmão não resultou em diferença de efeito citopático induzido por *F. solani*. Isso indica que a interação entre o fungo e ameba de origem ambiental pode resultar na modulação da virulência fúngica frente a mamíferos.

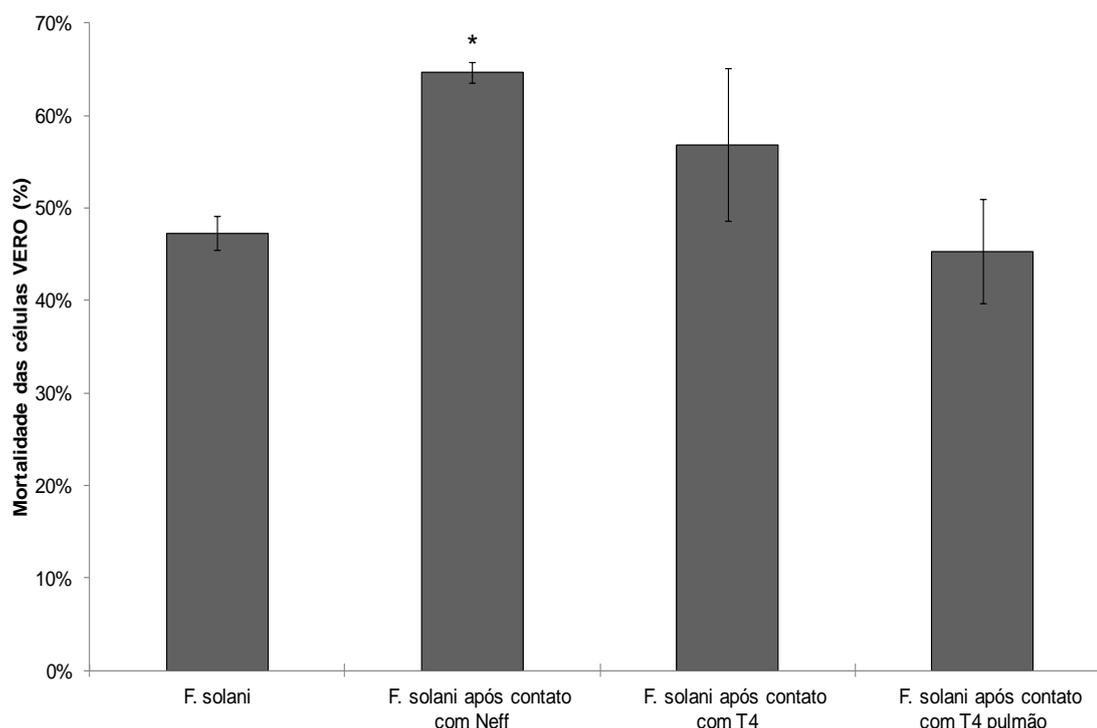


Figura 7. Efeito citopático de *F. solani*, antes e após contato com as cepas Neff, T4 e o isolado T4 pulmão de *A. castellanii*. O efeito citopático foi avaliado por meio da mortalidade das células Vero após a exposição a *F. solani* (isoladamente) por 24h. Asterisco indica variação significativa da mortalidade das células VERO comparando os tratamentos com o fungo sem exposição à ameba (representado pela barra “*F. solani*”) e o fungo após o contato as cepas amebianas ($p < 0,05$).

Nos últimos anos, tem crescido em importância a hipótese de que a virulência fúngica em hospedeiros mamíferos foi selecionada e mantida por pressões seletivas no ambiente, incluindo aqui, a predação por ameba (Steenbergen *et al.*, 2003; Steenbergen *et al.*, 2004). *Acanthamoeba* spp. e macrófagos compartilham notáveis semelhanças em sua estrutura celular, fisiologia, captura de presas por meio da fagocitose e comportamento com patógenos microbianos (Siddiqui & Khan, 2012b). Steenbergen *et al.* (2001) demonstraram que macrófagos e amebas possuem mecanismos semelhantes de interação com *Cryptococcus neoformans* e que as características

criptocócicas que contribuem para a virulência em mamíferos, tais como, cápsula, síntese de melanina e fosfolipases, também promovem a sobrevivência da levedura em *A. castellanii*. Particularmente, dois resultados apresentados aqui são consistentes com a hipótese de que as amebas ambientais podem contribuir para a seleção e manutenção de certas características em fungos que conferem a estes micro-organismos a capacidade de virulência em mamíferos: a germinação de conídios dentro da ameba e o aumento do efeito citopático de *F. solani* após contato com a ameba. A germinação de conídios de *F. solani* no interior da ameba indica que o fungo foi capaz de resistir à digestão de *A. castellanii*, apesar de não ter sido possível determinar o compartimento celular no qual a germinação ocorreu. Van Waeyenberghe *et al.* (2013) reportaram que conídios de *Aspergillus fumigatus* foram capazes de escapar dos vacúolos alimentares e germinar dentro do citoplasma de *A. castellanii*. Possivelmente, os mesmos mecanismos utilizados pelos conídios de *A. fumigatus* para escapar dos processos de digestão de amebas, são usados contra macrófagos. Entretanto, mecanismos semelhantes em *Fusarium* são desconhecidos, embora se tenha demonstrado que macrófagos derivados de monócitos humanos são capazes de fagocitar conídios de *F. solani* (Winn *et al.*, 2003). Curiosamente, o contato com somente a cepa Neff potencializou o efeito citopático de *Fusarium solani* em células VERO, revelando um possível papel de *Acanthamoeba* na modulação da virulência fúngica. Corroborando com esse achado, a virulência de *C. neoformans* e *H. capsulatum* em camundongo pode ser aumentada pela passagem em *D. discoideum* e *A. castellanii*, respectivamente (Steenbergen *et*

al., 2003; Steenbergen *et al.*, 2004). Ademais, *A. polyghaga* potencializou a habilidade de *Penicillium spinulosum* em induzir citotoxicidade e respostas inflamatórias em macrófagos, mas não afetou a capacidade de *Aspergillus versicolor* e *Stachybotrys chartarum* (Yli-Pirilä *et al.*, 2007). Esses estudos demonstram que ameba pode promover varias características microbianas potencialmente adversas para mamíferos e esse efeito não é limitado às bactérias, abrangendo também os fungos. Considerando que os macrófagos são importantes na resposta imune contra *Fusarium* spp. (Hu *et al.*, 2009), a seleção acidental de traços de virulência fúngicos por *Acanthamoeba* podem auxiliar a sobrevivência de *F. solani* em hospedeiros animais.

5.7. Implicações na ceratite

F. solani é um micro-organismo resistente à ameba, visto que o fungo resistiu à destruição pela ameba, e ainda mais, explorou *A. castellanii* de múltiplas formas amplificando o seu crescimento. No entanto, *F. solani* não parece ser um endossimbionte, uma vez que os conídios permaneceram internalizados transitoriamente. Provavelmente é uma relação de protocooperação, dado que ambos organismos se “beneficiaram” em algum grau, ainda que o contato entre os eles possa ser considerado um fator de estresse, o qual desencadeia muitas das reações observadas. Independente disso, a interação entre *A. castellanii* e *F. solani* pode representar um sério problema de saúde pública, particularmente no contexto da ceratite. Primeiro: *F. solani* aumentou significativamente o número de conídios na presença ameba, provendo um grande inóculo fúngico, o qual pode ser vetorizado por meio de lentes de contato para a córnea, visto que contaminações mistas de

fungo e ameba em estojos de lentes de contato já foram reportadas (Gray *et al.*, 1995). Em segundo lugar, o fungo promoveu o encistamento das amebas T4 e T4 pulmão. Considerando que o cisto é resistente à maior parte dos medicamentos utilizados no tratamento de ceratite, o contato entre os organismos supracitados pode levar a uma maior persistência de ameba no local da infecção e conseqüente recorrência da doença. Além disso, o sobrenadante da cultura fúngica afetou o perfil de susceptibilidade da cepa Neff à clorexidina, ou seja, o fungo foi capaz de desencadear efeitos potencialmente adversos ao tratamento, já tão complexo, da ceratite por *Acanthamoeba*. Finalmente, após contato com a cepa Neff, *F. solani* aumentou o efeito citopático contra células de mamíferos, indicando um possível papel da ameba na modulação da virulência fúngica. Hu *et al.* (2009) demonstraram, em um modelo de ceratite por *Fusarium solani*, que a depleção de macrófagos locais resultou em infecções graves ao impedir a geração de resposta imune específica e não específica ao fungo. Como a ameba e macrófagos humanos compartilham características semelhantes, *Acanthamoeba* pode estar implicada na seleção acidental de características de virulência fúngicas no ambiente, as quais podem auxiliar *F. solani* a escapar ou sobreviver em macrófagos humanos, resultando no agravamento da ceratite e de outras infecções (Van Waeyenberghe *et al.*, 2013). Entretanto para confirmar essa hipótese são necessários estudos *in vivo* demonstrando a resposta imune de macrófagos contra *F. solani* após o contato com a ameba.

6. CONCLUSÕES

A. castellanii foi capaz de fagocitar os conídios de *F. solani*, porém o fungo é um organismo resistente à ameba, capaz de explorá-la de múltiplas maneiras. Não somente a ameba viva induziu o crescimento fúngico, mas também o sobrenadante e o lisado amebianos aumentaram a esporulação de *F. solani*. Por outro lado, a ameba também se beneficiou com essa interação, aumentando a sua sobrevivência seja na presença do fungo vivo ou do sobrenadante da cultura fúngica.

A interação entre fungo-ameba é uma relação de protocooperação, pois é uma associação transitória que acarreta benefícios para ambos organismos. Além disso, essa interação demonstrou ser capaz de modular importantes características nesses micro-organismos. O fungo aumentou o encistamento da cepa T4 e do isolado T4 pulmão e a resistência a clorexidina na cepa Neff. Por sua vez, o fungo aumentou o efeito citopático sobre células de mamíferos após o contato com a ameba ambiental. Essas características estão implicadas, de forma direta ou indireta, na virulência de *A. castellanii* e *F. solani* e assim, podem ter um efeito potencialmente adverso na patogênese desses organismos, particularmente na ceratite.

Em resumo, os resultados apresentados revelaram apenas o início de um vasto campo de estudo: a interação entre AVLs e fungos filamentosos. A partir deste trabalho, novas proposições podem ser lançadas, tais como, qual o real significado dessa interação *in vivo* e suas implicações na ceratite. Especialmente em infecções mistas, o conhecimento aqui agregado pode ser

útil no manejo da ceratite, visto que *Acanthamoeba* e *Fusarium* podem interagir promovendo características de virulência, as quais podem prejudicar o tratamento convencional dessa doença.

7. REFERÊNCIAS

AKSOZEK, A.; McCLELLAN, K.; HOWARD, K.; NIEDERKORN, J.Y.; ALIZADEH, H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical and radiological conditions. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, p. 621–623, 2002.

ANAISSIE, E.J.; KUCHAR, R.T.; REX, J.H.; FRANCESCONI, A.; KASAI, M.; MULLER, F. M.; LOZANO-CHIU, M.; SUMMERBELL, R. C.; DIGNANI, M. C.; CHANOCK, S. J.; WALSH, T. J. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 11, p. 1871–1878, 2001.

BABU, K.; MURTHY, K.R. Combined fungal and *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis by in vitro confocal microscopy. **Eye**, v. 21, p. 271–272, 2007.

BARKER, J.; SCAIFE, H.; BROWN, M.R. Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.39, n.12, p. 2684–2688, 1995.

BEATTIE, T.K.; TOMLINSON, A.; MC FADYEN, A.K.; SEAL D.V.; GRIMASON, A.M.; Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: a new risk factor for infection? **Ophthalmology**, v.110, p.765–771, 2003.

BOTTONE, E.J.; MADAYAG, R.M.; QURESHI, M.N. *Acanthamoeba* keratitis. Synergy between amoebic and bacterial co-contaminants in contact lens care systems as a prelude to infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p 2447–2450, 1992.

BOUTATI, E.I.; ANAISSIE, E.J. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. **Blood**, v.90, p.999–1008, 1997.

BOWERS, B.; OLSZEWSKI, T.E. *Acanthamoeba* discriminates internally between digestible and indigestible particles. **The Journal of cell biology**, v.97, n.2, p.317–322, 1983.

BRANDT, F.H.; WARE, D.A.; VISVESVARA, G.S.; Viability of *Acanthamoeba* cysts in ophthalmic solutions. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 1144–1146, 1989.

CARIELLO, A.J.; PASSOS, R.M.; YU, M.C.Z.; HOFLING-LIMA, A. L. Microbial keratitis at a referral center in Brazil. **International ophthalmology**, v.31, n.3, p.197–204, 2011.

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

CATEAU, E.; MERGEY, T.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; RODIER, M.H. Relationships between free living amoebae and *Exophiala dermatitidis*: a preliminary study. **Medical Mycology**, v.47, n.1, p. 115–118, 2009.

CATEAU, E.; VERDON, J.; FERNANDEZ, B.; HECHARD, Y.; RODIER, M.H. *Acanthamoeba* sp. promotes the survival and growth of *Acinetobacter baumannii*. **FEMS microbiology letters**, v.319, n.1, p. 19–25, 2011.

CATEAU, E.; HECHARD, Y.; FERNANDEZ, B.; RODIER, M.H. Free living amoebae could enhance *Fusarium oxysporum* growth. **Fungal Ecology**, v.8, p.12–17, 2014.

CENGIZ, A.M.; HARMIS, N.; STAPLETON, F. Co-incubation of *Acanthamoeba castellanii* with strains of *Pseudomonas aeruginosa* alters the survival of amoeba. **Clinical & experimental ophthalmology**, v.28, n.3, p.191–193, 2000.

CHANG, D.C.; GRANT, G.B.; O'DONNELL, K.; WANNEMUEHLER, K.A.; NOBLE-WANG, J.; RAO, C.Y.; JACOBSON, L.M.; CROWELL, C.S.; SNEED, R.S.; LEWIS, F.M.T.; SCHAFFZIN, J.K.; KAINER, M.A.; GENESE, C.A.; JONES, D.B.; SRINIVASAN, A.; FRIDKIN, S. K.; PARK, B.J. Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. **Jama**, v. 296, n.8, p. 953–963, 2006.

CHRISMAN, C.J.; ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by, and nonlytic exocytosis from, *Acanthamoeba castellanii*. **Applied and environmental microbiology**, v.76, n.18, p. 6056–6062, 2010.

CIRILLO, J.D.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L.S. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. **Infection and Immunity**, v.62, p.3254–3261, 1994.

CIRILLO, J.D., FALKOW, S.; TOMPKINS, L.S.; BERMUDEZ, L.E. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. **Infection and Immunity**, v.65, p.3759–3767, 1997.

CIRILLO, J.D.; CIRILLO, S.L.; YAN, L.; BERMUDEZ, L.E.; FALKOW, S; TOMPKINS, L.S. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. **Infection and Immunity**, v.67, n9, p.4427–4434, 1999.

CLARKE, D.W.; NIEDERKORN, J.Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Trends in parasitology**, v. 22, p. 175-180, 2006.

COLEMAN, J.J.; MUHAMMED, M.; KASPERKOVITZ, P.V.; VYAS, J.M.; MYLONAKIS, E. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. **Fungal biology**, v.115, n.12, p. 1279–1289, 2011.

da ROCHA-AZEVEDO, B.; e SILVA-FILHO, F.C. Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga*: analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. **Archives of microbiology**, v.188, n.5, p. 441–449, 2007.

DEVONSHIRE, P.; MUNRO, F.A.; ABERNETHY, C.; CLARK, B.J. Microbial contamination of contact lens cases in the west of Scotland. **British journal of ophthalmology**, v.77, n.1, p. 41–45, 1993.

DOUESNARD-MALO, F.; DAIGLE, F. Increased persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhi in the presence of *Acanthamoeba castellanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.21, p. 7640–7646, 2011.

GRAY, T.B.; CURSONS, R.T.; SHERWAN, J.F.; ROSE, P.R. Acanthamoeba, bacterial, and fungal contamination of contact lens storage cases. **British journal of ophthalmology**, v.79, n.6, p. 601–605, 1995.

GREUB, G.; RAOULT, D. Parachlamydiaceae: potential emerging pathogens. **Emerging infectious diseases**, v.8, n.6, p. 625–630, 2002.

GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p. 413–433, 2004.

HE, D.; HAO, J.; ZHANG, B.; YANG, Y.; SONG, W.; ZHANG, Y.; YOKOYAMA, K.; WANG, L. Pathogenic spectrum of fungal keratitis and specific identification of *Fusarium solani*. **Investigative ophthalmology & visual science**, Rockville, v.52, n.5, p. 2804–2808, 2011.

HU, J.; WANG, Y.; XIE, L. Potential role of macrophages in experimental keratomycosis. **Investigative ophthalmology & visual science**, v.50, n.5, p. 2087–2094, 2009.

HUA, X.; YUAN, X.; DI PIETRO, A.; WILHELMUS, K.R. The molecular pathogenicity of *Fusarium* keratitis: a fungal transcriptional regulator promotes hyphal penetration of the cornea. **Cornea**, v.29, n.12, p. 1440–1444, 2010.

IBRAHIM, M.M.; VANINI, R.; IBRAHIM, F.M.; FIORITI, L.S.; FURLAN, E.M.; PROVINZANO, L. M.; DE CASTRO, R.S.; SOUSA, S.J.; ROCHA, E.M. Epidemiologic aspects and clinical outcome of fungal keratitis in southeastern Brazil. **European journal of ophthalmology**, Milano, v.19, n.3, p. 355–361, 2009.

ILLINGWORTH, C.D.; COOK, S.D. *Acanthamoeba* keratitis. **Survey of ophthalmology**, v. 42, n.6, p. 493–508, 1998.

JONES, D.B.; VISVESVARA, G.S.; ROBINSON, N.R. (1975) *Acanthamoebae polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom, London, v. 1075, p. 221–232, 1975.

JOSLIN, C.E.; TU, E.Y.; SHOFF, M.E.; BOOTON, G.C.; FUERST, P.A.; McMAHON, T.T.; ANDERSON, R.J.; DWORKIN, M.S.; SUGAR, J.; DAVIS, F.G.; STAYNER, L.T. The association of contact lens solution use and *Acanthamoeba* keratitis. **American journal of ophthalmology**, v.144, n.2, p. 169–180, 2007.

KARSTEN, E.; WATSON, S.L.; FOSTER, L.J. Diversity of microbial species implicated in keratitis: a review. **The open ophthalmology journal**, v.6, p.110–124, 2012.

KHAN, N.A. The pathogenesis of *Acanthamoeba* infections: current status and future implications. **Eyertext**, 2004. Disponível em: <<http://eprints.bbk.ac.uk/policies.html>>. Acesso em 14 de janeiro de 2014.

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

KHOR, W. B.; AUNG, T.; SAW, S.M.; WONG, T.Y.; TAMBYAH, P.A.; TAN, A.L.; BEUERMAN, R.; LIM, L.; CHAN, W.K.; HENG, W.J.; LIM, J.; LOH, R.S.K.; LEE, S.B.; TAN, D.T. An outbreak of *Fusarium* keratitis associated with contact lens wear in Singapore. **Jama**, v.295, n.24, p.2867–2873, 2006.

KOEHLER, M.; LEITSCH, D.; FUERNKRANZ, U.; DUCHENE, M.; ASPOECK, H.; WALOCHNIK J. *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. **Parasitology Research**, v.102, p.1069–1072, 2008.

KU, J.Y.; CHAN, F.M.; BECKINGSALE, P. *Acanthamoeba* keratitis cluster: an increase in *Acanthamoeba* keratitis in Australia. **Clinical & experimental ophthalmology**, v.37, n.2, p.181–90, 2009.

LAMRABET, O.; MEDIE, F.M.; DRANCOURT, M. *Acanthamoeba polyphaga*-enhanced growth of *Mycobacterium smegmatis*. **PLoS One**, v.7, p. e29833, 2012.

LARKIN, D.F.; KILVINGTON, S.; EASTY, D.L. Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria. **British Journal of Ophthalmology**, v.74, n.3, p.133–135, 1990.

LEE, W.B.; GROSSNIKLAUS, H.E.; EDELHAUSER, H.F. Concurrent *Acanthamoeba* and *Fusarium* keratitis with silicone hydrogel contact lens use. **Cornea**, v.29, n.2, p.210–213, 2010.

LIN, H.C.; CHU, P.H.; KUO, Y.H.; SHEN, S.C. Clinical experience in managing *Fusarium solani* keratitis. **International journal of clinical practice**, v.59, n.5, p.549–554, 2005.

LIN, H.C.; HSIAO, C.H.; MA, D.H.K.; YEH, L.K.; TAN, H.Y.; LIN, M.Y.; HUANG, SCM. Medical treatment for combined *Fusarium* and *Acanthamoeba* keratitis **Acta Ophthalmologica**, v.87, n.2, p.199–203, 2009.

MABON, M. Fungal keratitis. **International ophthalmology clinics**, v.38, n.4, p.115–123, 1998.

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

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

MERHEJ, J.; RICHARD-FORGET, F.; BARREAU, C.; Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.91, p. 519–528, 2011.

MILTNER, E.C.; BERMUDEZ, L.E. *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.44, n7, p.1990–1994, 2000.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55–63, 1983.

NEILSON, J.B.; IVEY, M.H.; BULMER, G.S. *Cryptococcus neoformans*: pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. **Infection and immunity**, v.20, n.1, p.262–266, 1978.

NELSON, P.E., DIGNANI, M.C., ANAISSIE, E.J. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, n.4, p.479–504, 1994.

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.4, p.695–704, 2007.

O'BRART, D.P.S.; OPHTH, F.R.C.; GAVIN, E.A. Contact-Lens Associated Simultaneous *Fusarium* and *Acanthamoebia* Keratitis Treated with Therapeutic

Penetrating Keratoplasty. **Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology**, v.2, p. 171–175, 2011.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D.A.; RINALDI, M.G.; MAGNON, K.C.; COX, P.A.; REVANKAR, S.G.; SANCHE, S.; GEISER, D.M.; JUBA, J.H.; VAN BURIK, J.A.; PADHYE, A.; ANAISSIE, E.J.; FRANCESCONI, A.; WALSH, T.J.; ROBINSON, J.S. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.11, p. 5109–5120, 2004.

ODDS, F.C.; VAN GERVEN, F.; ESPINEL-INGROFF, A.; BARTLETT, M.S.; GHANNOUM, M. A.; LANCASTER, M.V.; PFALLER, M.A.; REX, J.H.; RINALDI, M.G.; WALSH, T.J. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi in vitro and antifungal treatment outcomes in animal infection models. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.42, n.2, p. 282–288, 1998.

OECHSLER, R.A.; YAMANAKA, T.M.; BISPO, P.J.; SARTORI, J.; YU, M.C.Z.; MELO, A. S. A.; MILLER, D.; HOFLING-LIMA, A.L. *Fusarium* keratitis in Brazil: genotyping, in vitro susceptibilities, and clinical outcomes. **Clinical ophthalmology**, Auckland, v.7, p. 1693–1701, 2013.

PANJWANI, N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* Keratitis. **The Ocular Surface**, v.8, n.2, p.70–79, 2010.

PATEL, A.; HAMMERSMITH, K. Contact lens-related microbial keratitis: recent outbreaks. **Current opinion in ophthalmology**, v.19, n.4, p. 302–306, 2008.

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, 2008.

PETTIT, D.A.D.; 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. **The Journal of parasitology**, v. 82, p. 769–777, 1996.

PIDHERNEY, M.S.; ALIZADEH, H.; STEWART, G.L.; MCCULLEY, J.P.; NIEDERKORN, J.Y. In vitro and in vivo tumoricidal properties of a pathogenic/free-living amoeba. **Cancer letters**, v. 72, p. 91–98, 1993.

RAAD, I.; TARRAND, J.; HANNA, H.; ALBITAR, M.; JANSSEN, E.; BOKTOUR, M.; BODEY, G.; MARDANI, M.; HACHEM, R.; KONTOYIANNIS, D.; WHIMBEY, E.; ROLSTON, K. Epidemiology, molecular mycology, and environmental

sources of *Fusarium* infection in patients with cancer. **Infection control and hospital epidemiology**, v.23, n.9, p. 532–537, 2002.

RADFORD, C.; LEHMAN, O.; DART, J.K.G. *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992-6. **The British journal of ophthalmology**, London, v. 82, p. 1387–1392, 1998.

RODRÍGUEZ-ZARAGOZA, S. Ecology of free-living amoebae. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 20, n. 3, p. 225–241, 1994.

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**, v.49, n.3, p.1010–1015, 2008.

SCHMITZ-ESSER, S.; TOENSHOFF, E.R.; HAIDER, S.; HEINZ, E.; HOENNINGER, V.M.; WAGNER, M.; HORN, M. Diversity of bacterial endosymbionts of environmental *Acanthamoeba* isolates. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 18, p. 5822–5831, 2008.

SHAH, A.; SACHDEV, A.; COGGON, D.; HOSSAIN, P. Geographic variations in microbial keratitis: an analysis of the peer-reviewed literature. **British Journal of Ophthalmology**, v. 95, n.6, p. 762–767, 2011.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N.A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasites & Vectors**. v. 5, p. 6–19, 2012a.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N.A. *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: A myth or reality? **Experimental parasitology**, v. 130, n.2, p. 95–97, 2012b.

SIMMONS, P.A.; TOMLINSON, A.; SEAL, D.V. The role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the attachment of *Acanthamoeba* to four types of hydrogel contact lens materials. **Optometry & Vision Science**, v. 75, p. 860–866, 1998.

SINCLAIR, J.L.; MCCLELLAN, J.F.; COLEMAN, D.C. Nitrogen Mineralization by *Acanthamoeba polyphaga* in Grazed *Pseudomonas paucimobilis* Populations. **Applied Environmental Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 667–671, 1981.

STEENBERGEN, J.N.; SHUMAN, H.A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 15245–15250, 2001.

STEENBERGEN, J.N.; NOSANCHUK, J.D.; MALLIARIS, S.D.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the

genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. **Infection and immunity**, v. 71, n. 9, p. 4862–4872, 2003.

STEENBERGEN, J.N.; NOSANCHUK, J.D.; MALLIARIS, S.D.; CASADEVALL, A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3478–3488, 2004.

SZCZOTKA-FLYNN, L.B.; PEARLMAN, E.; GHANNOUM, M. Microbial contamination of contact lenses, lens care solutions, and their accessories: a literature review. **Eye & contact lens**, v. 36, n. 2, p. 116–129, 2010.

TARABISHY, A.B.; ALDABAGH, B.; SUN, Y.; IMAMURA, Y.; MUKHERJEE, P.K.; LASS, J.H.; Ghannoum, M.A.; PEARLMAN, E. MyD88 regulation of *Fusarium* keratitis is dependent on TLR4 and IL-1R1 but not TLR2. **The Journal of Immunology**, Rockville Pike, v. 181, n. 1, p. 593–600, 2008.

THOMAS, P.A. Current perspectives on ophthalmic mycoses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 730–797, 2003a.

THOMAS, P.A. Fungal infections of the cornea. **Eye**, v. 17, n. 8, p. 852–862, 2003b.

THOMAS, V.; MCDONNELL, G.; DENYER, S.P.; MAILLARD, J.Y. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 3, p. 231–259, 2010.

TOMLINSON, A.; SIMMONS, P.A.; SEAL, D.V.; MC FADYEN, A.K.; Salicylate inhibition of *Acanthamoeba* attachment to contact lenses: a model to reduce risk of infection. **Ophthalmology**, v. 107, n. 1, p. 112–117, 2000.

VAN WAEYENBERGHE, L.; BARE, J.; PASMANS, F.; CLAEYS, M.; BERT, W.; HAESEBROUCK, F.; HOUF, K.; MARTEL, A. Interaction of *Aspergillus fumigatus* conidia with *Acanthamoeba castellanii* parallels macrophage-fungus interactions. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 6, p. 819–824, 2013.

VANESSA, B.; VIRGINIE, M.; NATHALIE, Q.; MARIE-HÉLÈNE, R.; CHRISTINE, I. *Hartmannella vermiformis* can promote proliferation of *Candida* spp. in tap-water. **Water Research**, v. 46, n. 17, p. 5707–5714, 2012.

VEMUGANTI, G.K.; GARG, P.; GOPINATHAN, U.; NADUVILATH, T.J.; JOHN, R.K.; BUDDI, R.; RAO, G.N. Evaluation of agent and host factors in progression of mycotic keratitis: A histologic and microbiologic study of 167 corneal buttons. **Ophthalmology**, v. 109, p. 1538–1546, 2002.

VERÍSSIMO, C. de M.; MASCHIO, V.J.; CORREA, A.P.F.; BRANDELLI, A.; ROTT, M.B. Infection in a rat model reactivates attenuated virulence after long-term axenic culture of *Acanthamoeba* spp. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 832–835, 2013.

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

WALOCHNIK, J.; HALLER-SCHOBBER, 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**, v. 38, n. 11, p. 3932–3936, 2000.

WINN, R.M.; GIL-LAMAIGNERE, C.; MALOUKOU, A.; ROILIDES, E. Interactions of human phagocytes with moulds *Fusarium* spp. and *Verticillium nigrescens* possessing different pathogenicity. **Medical Mycology**, v. 41, n. 6, p. 503–509, 2003.

WOLOSHUK, C.P.; SHIM, W.B. Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. 94–109, 2013.

YLI-PIRILÄ, T.; KUSNETSOV, J.; HIRVONEN, M.R.; SEURI, M.; NEVALAINEN, A. Effects of amoebae on the growth of microbes isolated from moisture-damaged buildings. **Canadian journal of microbiology**, v. 52, n. 4, p. 383–390, 2006.

YLI-PIRILÄ, T.; HUTTUNEN, K.; NEVALAINEN, A.; SEURI, M.; HIRVONEN, M.R. Effects of co-culture of amoebae with indoor microbes on their cytotoxic and proinflammatory potential. **Environmental toxicology**, v. 22, n. 4, p. 357–367, 2007.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO A.

Meio Proteose Peptona - Extrato de Levedo - Glicose (PYG)

7,5g de Proteose Peptona

0,75g de Extrato de levedo

0,98g de Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

0,059g de Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

1g de Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

0,02g de Sulfato ferroso amoniacal [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]

0,034g de Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)

0,355g de Hidrogenofosfato dissódico anidro (NaH_2PO_4)

15g de Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)

Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do CaCl_2 que foi dissolvido separadamente e adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em $6,5 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem (121°C por 15 min).

8.2 ANEXO B.

Tampão fosfato salino (PBS) 10 X concentrado

85,0g de Cloreto de sódio (NaCl)

15,5g de fosfato de sódio bibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

2,3g de dihidrogenofosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

Água deionizada q.s.p. 1000ml

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos juntos. O pH foi ajustado em $7,2 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem (121 °C por 15 min).

Para o preparo da solução tampão fosfato de sódio 1X, 1 parte da solução de PBS 10X foi diluída em 9 partes de água destilada deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem (121 °C por 15 min).