

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Bruna Madeira de Sousa Fiuza

**Papel das vesículas extracelulares na diferenciação de
estágios de *Acanthamoeba***

Belo Horizonte

2025

Bruna Madeira de Sousa Fiuza

**Papel das vesículas extracelulares na diferenciação
de estágios de *Acanthamoeba***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Dra. Adriana Oliveira Costa
Coorientadora: Dra. Isabela Aurora Rodrigues

Belo Horizonte

2025

F565p Fiuza, Bruna Madeira de Sousa.
Papel das vesículas extracelulares na diferenciação de estágios de *Acanthamoeba* [recurso eletrônico] / Bruna Madeira de Sousa Fiuza. – 2025.
1 recurso eletrônico (65 f. : il.) : pdf

Orientadora: Adriana Oliveira Costa.
Coorientadora: Dra. Isabela Aurora Rodrigues.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. *Acanthamoeba* – Teses. 2. Vesículas extracelulares – Teses. 3. Encistamento de parasitas – Teses. 4. Ciclo celular – Teses.
I. Costa, Adriana Oliveira. II. Rodrigues, Isabela Aurora. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:616.96



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

"PAPEL DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES NA DIFERENCIAÇÃO DE ESTÁGIOS DE ACANTHAMOEBA"**BRUNA MADEIRA DE SOUSA FIUZA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia quatro de abril de dois mil e vinte e cinco, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Armando de Menezes Neto

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas

Érica dos Santos Martins Duarte

UFMG

Isabela Aurora Rodrigues - coorientadora

UFMG

Adriana Oliveira Costa - Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 04 de abril de 2025



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Oliveira Costa, Professora do Magistério Superior**, em 04/04/2025, às 13:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Erica dos Santos Martins Duarte, Professora do Magistério Superior**, em 05/04/2025, às 18:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Armando de Menezes Neto, Usuário Externo**, em 08/04/2025, às 11:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Isabela Aurora Rodrigues, Usuária Externa**, em 25/06/2025, às 10:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4029354** e o código CRC **115B5A21**.

Agradecimentos

Primeiro, agradeço a Deus por estar presente na minha vida e me ajudar a trilhar meu caminho.

Agradeço a minha mãe e irmãs que sempre me apoiaram.

Agradeço ao Caio pelo companheirismo diário.

À minha orientadora, Dra. Adriana Costa, pela receptividade que tem com todos os seus alunos e que teve comigo desde a primeira visita, sempre me ajudando e tornando este caminho muito mais leve e possível. Durante esse período, posso dizer que meu crescimento pessoal e acadêmico aconteceu graças ao seu apoio, paciência, ensinamentos e carinho, que me acompanharão por toda a vida.

À minha coorientadora Dr. Isabela Aurora Rodrigues pela amizade de mais de 14 anos, pela confiança, por acreditar em mim e por me ensinar tantas coisas sempre sendo essa pessoa doce e de bom coração.

Aos colaboradores, Beto e Kamille que me ajudaram e fizeram parte desse caminho.

Agradeço novamente a Deus por permitir que essas pessoas tão maravilhosas entrassem na minha vida, me ajudando a ser uma pessoa melhor e que vão estar para sempre no meu coração.

A todo o corpo docente e discente do programa de Pós de Análises Clínicas e Toxicológicas- ACT pelas aulas, parcerias e amizades.

Às agências financiadoras CAPES pela concessão da minha bolsa e a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG pelo financiamento dos experimentos.

Resumo

Amebas do gênero *Acanthamoeba*, agentes causadores da ceratite amebiana e da Encefalite Amebiana Granulomatosa, apresentam em seu ciclo formas trofozoíticas e císticas, que se alternam no ambiente e no tecido infectado. Sabe-se que trofozoítos ativos de *Acanthamoeba* liberam vesículas extracelulares (VEs), partículas membranosas que carregam fatores de patogenicidade. No processo de encistamento, os trofozoítos sofrem alterações estruturais e metabólicas, o que poderia resultar em mudanças funcionais nas VEs produzidas. O objetivo deste estudo foi caracterizar VEs de trofozoítos em encistamento, comparativamente a de trofozoítos ativos, avaliando o papel funcional das diferentes populações no ciclo celular de *Acanthamoeba*. Para isso, trofozoítos foram induzidos a encistar em salina de encistamento NEFF por 4h (encistamento precoce) e 24h (encistamento tardio). VEs de trofozoítos ativos também foram obtidas para comparação, a partir da incubação destas formas em meio RPMI por 2h. Os sobrenadantes foram processados para concentração das VEs por filtração (0,22 μ m) e ultracentrifugação (150.000g, 4h). Após caracterização geral (microscopia eletrônica de varredura e transmissão, análise de rastreamento de nanopartículas, perfil proteico), as VEs de cada população foram avaliadas por técnica zimográfica. O efeito da adição de VEs exógenas ($\sim 10^4$ VEs/forma) no crescimento, no encistamento e no desencistamento também foi avaliado. As VEs apresentaram dimensões entre 100 e 200 nm, com tamanho modal aproximado de 150 nm e concentração entre $1,5 \times 10^{11}$ e $3,5 \times 10^{11}$ partículas/mL, sem diferenças estatísticas entre as populações ($p = 0,65$). A zimografia identificou majoritariamente serinoproteases nas VEs de trofozoítos ativos (TA) e cisteíno-proteases nas VEs de formas em encistamento. VEs exógenas derivadas de TA induziram maior multiplicação de trofozoítos em meio PYG, efeito observado às 24h de interação ($p < 0,0001$). A adição de VEs de encistamento precoce (EP) e tardio (ET) à cultura levou à formação de maior quantidade de cistos às 48h ($p < 0,0001$). No encistamento em salina de NEFF, vesículas EP e ET também induziram maior número de cistos comparado ao controle NEFF ($p < 0,0008$). No protocolo aplicado para avaliar o desencistamento, as VEs de TA induziram maior quantidade de trofozoítos após 48h e 72h ($p < 0,0001$), e por outro lado, vesículas EP e ET impediram o desencistamento. Em conjunto, estes dados evidenciam diferenças funcionais entre VEs de trofozoítos em crescimento e em encistamento, indicando um papel ativo na comunicação célula a célula em *Acanthamoeba*.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*; vesículas extracelulares; encistamento; ciclo celular.

Abstract

Amoebae of the genus *Acanthamoeba* are the causative agents of *Acanthamoeba* keratitis and Granulomatous Amoebic Encephalitis. They alternate between the stages of trophozoites and cysts in their life cycle, either in the environment or in the tissues during the infection. *Acanthamoeba* active trophozoites release extracellular vesicles (EVs), membranous particles that carry pathogenicity factors. Upon the encystation trigger, the trophozoite undergoes structural and metabolic changes, which may lead to functional alterations in the EVs it produces. The objective of this study was to characterize EVs from trophozoites undergoing encystation, compared to those from active trophozoites, evaluating the functional role of these distinct EV populations in the *Acanthamoeba* life cycle. For this purpose, trophozoites were induced to encyst in NEFF encystation saline for 4 hours (early encystation) and 24 hours (late encystation). EVs from active trophozoites were also collected for comparison by incubating these forms in RPMI medium for 2 hours. Supernatants were processed to concentrate EVs using filtration (0.22 μm) and ultracentrifugation (150,000g, 4 hours). After general characterization (scanning and transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis, and protein profiling), the EVs from each population were evaluated by zymographic techniques. The effects of adding exogenous EVs ($\sim 10^4$ EVs/form) on growth, encystation, and excystation were also assessed. The EVs exhibited dimensions ranging from 100 to 200 nm, with a modal size of approximately 150 nm and a concentration between 1.5×10^{11} and 3.5×10^{11} particles/mL, without statistical differences between populations ($p = 0.65$). Zymography predominantly identified serine proteases in EVs from active trophozoites (AT) and cysteine proteases in EVs from encysting forms. Exogenous EVs derived from AT induced greater trophozoites multiplication in the PYG medium, an effect observed at 24 hours of interaction ($p < 0.0001$). The addition of EVs from early (EP) and late (ET) encystation to the culture resulted in a greater number of cysts after 48 hours ($p < 0.0001$). In NEFF saline encystation conditions, EP and ET vesicles also induced a higher number of cysts compared to the NEFF control ($p < 0.0008$). In the excystation protocol, AT-derived EVs induced a higher number of trophozoites after 48 and 72 hours ($p < 0.0001$), whereas EP and ET vesicles inhibited excystation. Taken together, these findings highlight functional differences between EVs from growing and encysting trophozoites, demonstrating an active role in cell-to-cell communication in *Acanthamoeba*.

Keywords: *Acanthamoeba*; extracellular vesicles; encystation; cell cycle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Lesão causada por <i>Acanthamoeba</i> spp.	17
Figura 2 – Lesão causada por EAG	20
Figura 3 – O processo de invasão da córnea por <i>Acanthamoeba</i>	22
Figura 4 – Lesões causadas por Ceratite Amebiana	23
Figura 5 – Classificação filogenética de <i>Acanthamoeba</i> em relação às outras amebas de vida livre	25
Figura 6 – Esquema comparativo da classificação de Pussard e Pons (1977) baseada na morfologia dos cistos, dos 3 diferentes grupos de <i>Acanthamoeba</i>	26
Figura 7 – Comparativo entre os genótipos de <i>Acanthamoeba</i> e as patologias associadas	27
Figura 8 – Trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> provenientes de cultura em meio PYG	28
Figura 9 – Cistos de <i>Acanthamoeba</i> em cultura	29
Figura 10 – Liberação de Vesículas e Exossomos	32
Figura 11 – Demonstração de Ves de diferentes parasitas, com suas respectivas ações dependendo da espécie ou da forma evolutiva	33
Figura 12 – Esquema experimental do ensaio de adição de vesículas extracelulares (VEs) exógenas a cultura de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i>	40
Figura 13 – Esquema experimental do ensaio de adição de vesículas extracelulares (VEs) a cultura de <i>Acanthamoeba</i> em encistamento	41
Figura 14 – Esquema experimental do ensaio de adição de vesículas extracelulares (VEs) exógenas a cultura de cistos de <i>Acanthamoeba</i> , para avaliação de desencistamento	42
Figura 15 – Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) de <i>Acanthamoeba</i> obtidas de formas em encistamento e de formas ativas	43
Figura 16 – Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de vesículas extracelulares (VEs) de <i>Acanthamoeba</i> derivadas de trofozoítos em encistamento e de trofozoítos ativos	44
Figura 17 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> em encistamento e ativos	45
Figura 18 – Zimografia de vesículas extracelulares (VEs) de <i>Acanthamoeba</i> obtidas de trofozoítos em encistamento e ativos	46
Figura 19 – Avaliação da multiplicação de <i>Acanthamoeba</i> em meio PYG e do efeito de adição de vesículas extracelulares (VEs) exógenas	47
Figura 20 – Avaliação do encistamento de <i>Acanthamoeba</i> em meio NEFF e do efeito da adição de vesículas extracelulares (VEs) exógenas	48
Figura 21 – Efeito da adição de vesículas extracelulares (VEs) exógenas no desencistamento de <i>Acanthamoeba</i> .	49

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACIONES

°C	Grau Celsius
<	Menor
>	Mayor
AVL	Amebas de Vida Livre
BCA	Ácido Biciconínico (Bicinchoninic Acid Assay)
CA	Ceratite Amebiana
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Centro de Prevenção de Doenças)
CN	Controle Negativo
EAG	Encefalite Amebiana Granulomatosa
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EP	Encistamento Precoce
ET	Encistamento Tardio
h	Hora
IL-6	Intereucina-6
kDa	Kilodaltons
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MVBs	Corpos multivesiculares
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetro
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis

NO	Óxido nítrico
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonila
PYG	Meio Proteose Peptone-Extrato de Levedo-Glicose
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotação por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)
SDS- PAGE	Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida
SFB	Soro Fetal Bovino
TA	Trofozoíto ativo
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
TRITON X-100	Polietilenoglicol-terc-octilfenil éter
VEs	Vesículas extracelulares
μ L	Microlitro
μ M	Micromol
μ m	Micrômetro
xg	Gravidade

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Acantamebíases	16
2.2 Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG)	18
2.3 Ceratite Amebiana	21
2.4 Histórico e classificação taxonômica do gênero <i>Acanthamoeba</i>	24
2.5 Morfologia e biologia de <i>Acanthamoeba</i>	28
2.6 Vesículas extracelulares (VEs)	30
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral:	34
3.2 Objetivos Específicos:	34
4 METODOLOGIA	35
4.1 Cultivo de <i>Acanthamoeba</i>	35
4.2 Vesiculação	35
4.2.1 Trofozoítos em encistamento	35
4.2.2 Trofozoítos ativos	36
4.3 Isolamento das vesículas extracelulares	36
4.4 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	36
4.5 Quantificação proteica	37
4.6 Microscopia eletrônica	37
4.7 Zimografia	38
4.8 Efeito das VEs na multiplicação de <i>Acanthamoeba</i>	39
4.9 Efeito das VEs no encistamento de <i>Acanthamoeba</i>	40
4.10 Efeito das VEs no desencistamento de <i>Acanthamoeba</i>	41
4.11 Análises estatísticas	42
5 RESULTADOS	42
5.1 Diferentes formas evolutivas de <i>Acanthamoeba</i> produzem VEs com características biofísicas similares	42
5.2 VEs de trofozoítos em encistamento e ativos apresentam características ultraestruturais semelhantes	44
5.3 VEs de formas em encistamento apresentam perfil zimográfico distinto das VEs de trofozoítos ativos	45

5.4 O desenvolvimento das formas em meio PYG é afetado pela adição de vesículas extracelulares exógenas	46
5.5 Vesículas extracelulares exógenas obtidas de formas em encistamento estimulam a formação de cistos	48
5.6 Vesículas extracelulares exógenas podem retardar ou estimular o desencistamento de <i>Acanthamoeba</i>	49
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO	65

1 INTRODUÇÃO

As acantamebíases constituem um grupo de infecções provocadas por *Acanthamoeba*, um protozoário pertencente ao grupo das amebas de vida livre (AVL). As AVLS estão amplamente distribuídas no ambiente, e, embora a maior parte das espécies sejam inofensivas para os humanos, algumas delas, como *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, *Sappinia pedata* e a própria *Acanthamoeba* são capazes de causar doenças graves e até mesmo fatais (KOFMAN *et al.*, 2022). As infecções principais causadas por *Acanthamoeba* são a Ceratite Amebiana (CA) e a Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) (SIDDIQUI; KHAN, 2017; COSTA *et al.*, 2021).

A CA é uma infecção ocular grave, dolorosa e de difícil diagnóstico, no qual o protozoário consegue penetrar na córnea, causando uma inflamação que pode agravar e levar a cegueira (DESAI *et al.*, 2022). A EAG, por sua vez, é uma doença progressiva que afeta o sistema nervoso central (SNC) principalmente de pessoas imunocomprometidas, incluindo portadores de imunodeficiência adquirida (HIV), receptores de transplantes e pacientes com lúpus ou em tratamento para o câncer. Devido a gravidade da doença a taxa de mortalidade é alta, podendo ser superior a 90% (SIDDIQUI; KHAN, 2012).

O ciclo biológico de *Acanthamoeba* favorece a permanência e sobrevivência no ambiente tanto no amebinte quanto durante a infecção, pois esta ameba possui a capacidade de alternar entre duas formas de vida, o trofozoíto, metabolicamente ativo e o cisto, forma de resistência que sobrevive em condições hostis. *Acanthamoeba* adota a forma de trofozoíto quando as condições ambientais são propícias, sendo capaz de se alimentar e se multiplicar, além de exercer a maior parte dos danos durante a infecção. Quando falta alimento, há mudanças de pH, temperatura, umidade ou outros fatores adversos no meio, o protozoário se transforma em cistos. Nos casos de infecção, o protozoário pode permanecer em um estado inativo, na forma de cistos nos tecidos da córnea por até 31 meses com risco de recidivar, o que dificulta o tratamento (NIEDERKORN, 2021). Sua resistência é devido à dupla parede (ectocisto e endocisto), com uma composição complexa que inclui três grupos de lectinas ligadoras de celulose, que contribuem para a impedir a penetração eficaz de amebicidas (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020).

Considerando estes aspectos, alguns estudos estão explorando abordagens para tornar a *Acanthamoeba* mais suscetível aos amebicidas, com alternativas que possam afetar o cisto como substâncias com efeito cisticida (KARUSKY *et al.*, 2015) ou estratégias capazes de evitar o encistamento.

Nos últimos anos, diversos estudos têm mostrado que protozoários, assim como outras variadas classes de células liberam no meio partículas membranares denominadas vesículas extracelulares. As VEs de *Acanthamoeba* desempenham papéis funcionais como transporte molecular, regulação e comunicação intercelular (COSTA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2018; RETANA-MOREIRA *et al.* 2015, LIN *et al.*, 2019).

Em todos os estudos atuais sobre VEs de *Acanthamoeba*, os ensaios foram realizados com trofozoítos ativos do protozoário. Considerando que durante o encistamento os trofozoítos passam por mudanças morfológicas e funcionais antes de iniciarem a síntese da parede cística e tornarem-se metabolicamente inativos (LEITSCH *et al.*, 2010), é possível que tais mudanças possam se refletir nas características das VEs. Em um estudo com outro protista ameboide, o parasito intestinal *Entamoeba histolytica*, Sharma *et al.*, (2020) demonstrou que VEs produzidas por formas em encistamento são capazes de induzir outros trofozoítos a encistar, da mesma forma que VEs de trofozoítos ativos são capazes de inibir o encistamento.

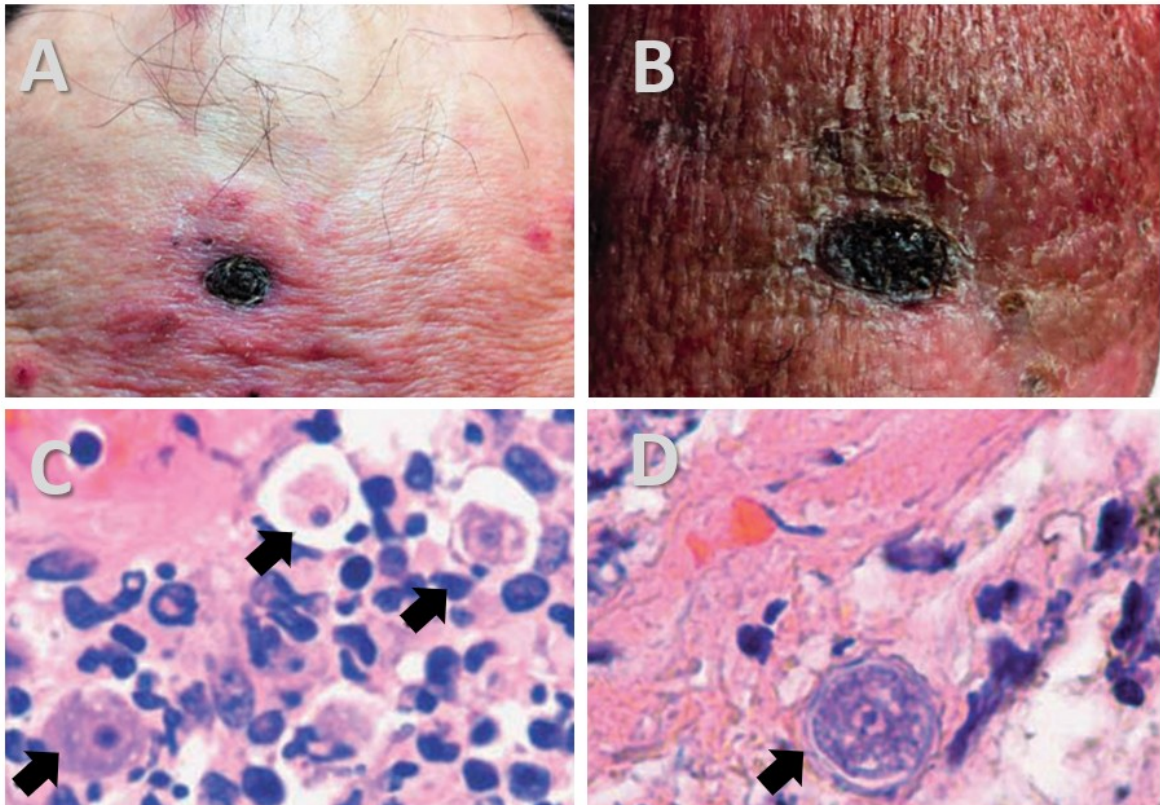
Com base no possível papel de sinalização de ciclo celular para este outro protista, estabelecemos a hipótese de que VEs de *Acanthamoeba* podem ser funcionalmente distintas, dependendo da fase do ciclo celular e que poderiam ter um papel na diferenciação do protozoário, carreando fatores de sinalização com efeito no encistamento ou desencistamento. Desta forma, descrevemos neste estudo uma estratégia experimental para obter VEs de trofozoítos ativos e em encistamento e avaliar o efeito da adição destas partículas no ciclo celular do protozoário.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Acantamebíases

Acantamebíases são definidas como infecções causadas por amebas do gênero *Acanthamoeba*, protozoário ubíquo que é considerado um parasito facultativo devido à sua natureza de vida livre, porém com capacidade de causar infecções em humanos e outros vertebrados (LUONG *et al.*, 2019). No ser humano, as manifestações principais das acantamebíases são a encefalite amebiana granulomatosa (EAG), em que o protozoário afeta o cérebro, principalmente de indivíduos imunocomprometidos ou com outras condições debilitantes, e a ceratite por *Acanthamoeba* (CA), quando ocorre infecção da córnea, a qual não é associada a imunocomprometimento. No entanto, o patógeno está relacionado também a outras manifestações como as infecções cutâneas, pulmonares e de outros órgãos, causando quadros sistêmicos que podem anteceder à forma cerebral (MARCIANO-CABRAL *et al.*, 2003). KOFMAN (2022) descreve que em indivíduos imunocomprometidos, em especial portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), quadros mais agravados de acantamebíases podem ocorrer, como o exemplo de um paciente que veio a óbito, portador de HIV com sinusite crônica, em que foram encontradas formas de *Acanthamoeba* no nasofaríngeo e nos seios respiratórios. Em outro exemplo, Morrison (2016) relatou o caso de um paciente positivo para trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* em lesões de pele ulceradas, nodulares com células necróticas, em forma de placas avermelhadas (**Figura 1**). Este paciente apresentava sinais clínicos de sinusite crônica e cefaleia, aos sinais clínicos não foram observadas alterações neurológicas. O diagnóstico foi conduzido através de biópsia com identificação de cistos no tecido e nos vasos sanguíneos da região lesionada. O paciente foi tratado para um quadro de sepse amebiana, mas não resistiu, vindo a óbito três semanas após o início do tratamento.

Figura 1 – Lesão causada por *Acanthamoeba* spp.



A. Lesão de pele em região de testa, **B.** lesão de pele em braço, **C.** infiltrado inflamatório com presença de trofozoítos (seta) corados pela coloração de hematoxilina e eosina (aumento de 400x), **D.** presença de cistos (seta) corados pela coloração de hematoxilina e eosina (aumento de 1000x).
Fonte: Adaptado de (KOFMAN *et al.*, 2022)

Outras condições debilitantes também podem levar a quadros de acantamebíase cutânea, como a situação descrita por Park *et al.*, (2023), referente a uma paciente portadora de diabetes tipo 2, diagnosticada por ensaio imunohistoquímica pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2025). Entretanto, devido a raridade da doença e a inespecificidade dos sintomas, o tratamento foi iniciado tardiamente e foi ineficiente, levando a paciente a óbito por septicemia secundária.

Recentemente Haston *et al.*, (2024) realizou um levantamento dos casos de acantamebíases ocorridos nos EUA, associados ao uso de água de torneira para enxague nasal. Na última década, 9 pacientes imunocomprometidos e com sinusite crônica apresentaram acantamebíase devido esse hábito. O quadro clínico dos

pacientes foi agravado devido a lesões de mucosa e alguns apresentaram sinais neurológicos, caracterizando a evolução para EAG (HASTON *et al.*, 2024).

2.2 Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG)

A Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) é uma infecção de caráter progressivo, de evolução a médio e longo prazo e que pode ser causada tanto por amebas do gênero *Acanthamoeba* quanto por outra AVL, denominada *Balamuthia mandrillaris*. Apesar de ser mais comumente associada a pessoas imunocomprometidas, a EAG também pode ocorrer em pacientes imunocompetentes (KHAN, 2006). SÜTÇÜ *et al.* (2019), relatou o caso de um paciente de apenas 9 anos, sem imunocomprometimento, que após nadar em um açude e estar recuperando de um traumatismo craniano, apresentou quadro de confusão focal. Após a realização de exames e uma biopsia, foi detectado formas de trofozoítos e cistos no SNC. Devido a conduta imediata e um tratamento agressivo o paciente apresentou bom prognóstico e estabilização do quadro.

Como exemplificado no caso acima, a porta de entrada da infecção pode ser a pele. Em imunocomprometidos, pode haver o desenvolvimento da acantamebíase cutânea ou infecção das vias aéreas superiores e pulmões antes da EAG. Uma revisão de casos de EAG por *Acanthamoeba* nos Estados Unidos indicou que o protozoário se localiza apenas no SNC em 55% dos casos, enquanto o restante envolve também outros órgãos (HALSTON *et al.*, 2023). Apesar de o curso da doença ainda não ser completamente elucidado, acredita-se que ocorre disseminação hematogênica e o patógeno consegue romper a barreira hematoencefálica pelo revestimento endotelial dos capilares cerebrais, gerando um processo inflamatório intenso (KALRA *et al.*, 2020). Após atingir o SNC, supõe-se que o protozoário é cercado pelo sistema imune inato, principalmente os macrófagos/monócitos, eosinófilos e linfócitos. Os macrófagos, por não conseguirem fagocitar as formas, secretam enzimas líticas que atuam nos trofozoítos, mas acabam lesando também a barreira hematoencefálica. Com isso as amebas aprofundam no tecido, onde também formam cistos (KHAN, 2006).

Os sintomas são inespecíficos, geralmente no início da doença apresentam-se como dor de cabeça, náuseas, febre baixa, irritabilidade, vertigem e letargia,

progredindo para ataxia, sinais neurológicos focais (principalmente associada ao nervo afetado). Já em estágios mais avançados, ocorre paralisia, aumento da pressão intracraniana e convulsões. Esses sinais clínicos estão muito associados a localização das lesões *post-mortem*, acometendo principalmente a região inferior do lobo frontal. Normalmente o óbito está associado ao processo inflamatório intenso, aumento da pressão intracraniana, hemorragia e convulsão (KHAN, 2006).

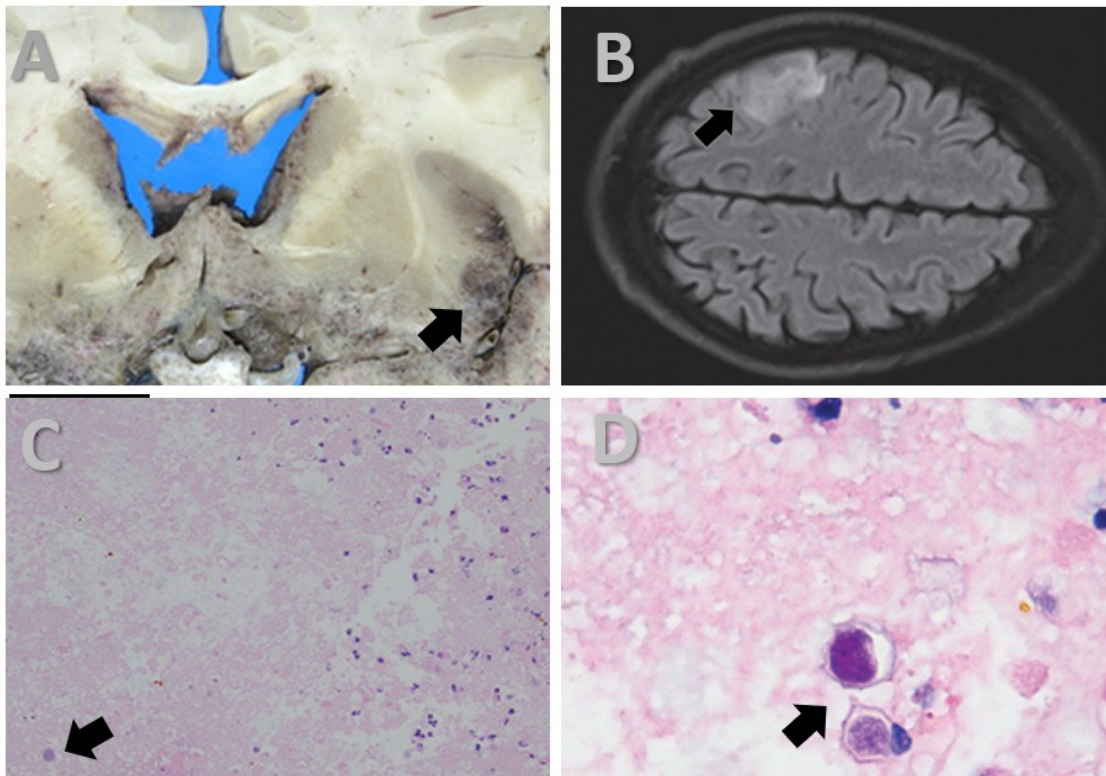
O diagnóstico é desafiador pois dificilmente se suspeita da infecção durante a anamnese e análise do histórico do paciente. Devido a sua raridade, normalmente é incluída na suspeita apenas quando todas as outras opções são esgotadas (KOFMAN, 2022). Exames sorológicos são limitados devido à ausência de testes comerciais disponíveis no mercado. Além disso, a positividade na sorologia para *Acanthamoeba* pode ocorrer em mais de 80% da população da população (BRINDLEY *et al.*, 2009), o que além de refletir o quanto o protozoário está sempre em contato com o ser humano, dificulta usar a produção de anticorpos como marcador de infecção. Exames complementares como exame no líquido cefalorraquidiano (LCR) podem ser realizados na tentativa de encontrar formas ativas do patógeno, mas raramente são encontradas. Isso ocorre porque a coloração usual é muitas vezes incapaz de diferenciar o protozoário de algumas células de defesa presentes no LCR como linfócitos e monócitos, gerando confusão visual para o microscopista. Sendo assim, uma amostra negativa não descarta a infecção (KOFMAN, 2022).

A biópsia cerebral, com coloração usando técnica imuno-histoquímica, assim como técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR), podem ser aliadas no diagnóstico. No diagnóstico *post-mortem*, é possível fazer vários cortes histopatológicos, com grande quantidade de material, permitindo maior probabilidade de visualização do protozoário (**Figura 2**) (KOFMAN, 2022).

O Centro de Prevenção as doenças (CDC) preconiza um regime de tratamento multimedicamentoso, na tentativa de conseguir maior efetividade. As opções terapêuticas, entretanto, têm como base a eficácia em estudos *in vitro* e os relatos de casos. Atualmente, as acantamebíases não são de notificação obrigatória (CDC, 2025). No entanto, devido à complexidade de diagnóstico e prognóstico, os médicos são encorajados a notificar os casos para monitoramento em alguns países como os EUA. Apesar de não existir um tratamento específico e eficaz são realizadas terapias combinadas de antibióticos, antifúngicos como anfotericina B e

Miltefosina, um agente anticancerígeno. Entretanto o sucesso do tratamento depende muito do tempo de resposta do paciente, do tempo de descoberta da doença, da carga parasitária e do sistema imune do hospedeiro (KALRA *et al.*, 2019).

Figura 2 – Lesão causada por EAG



A. Cérebro com alteração na coloração (cinza escuro), decorrente a doença (seta). **B.** Ressonância magnética de lesão cerebral lateralizada com presença de edema e cerebrite multifocal, **C.** biópsia com presença de Cisto (seta) corados pela coloração de hematoxilina e eosina (aumento de 20x). **D.** biópsia com presença de Cisto (seta) corados pela coloração de hematoxilina e eosina (aumento de 100x) Fonte: **A:** Adaptado de KOFMAN *et al.*, 2022; **B-D:** adaptado de GUARNER *et al.*, 2007.

Em um levantamento epidemiológico nos EUA de casos notificados, um total de 173 relatos, aproximadamente 3 por ano, foram relatados desde 1956 até 2020 (HALSTON *et al.*, 2024). A alta letalidade associada a EAG por *Acanthamoeba*, com índices de óbito acima de 97% (KALRA *et al.*, 2019; KOT *et al.*, 2018) reforça a importância de estudos que investiguem não apenas os fatores associados à patogênese, mas também o comportamento e a resistência deste protozoário em diferentes condições, *in vitro* e *in vivo*.

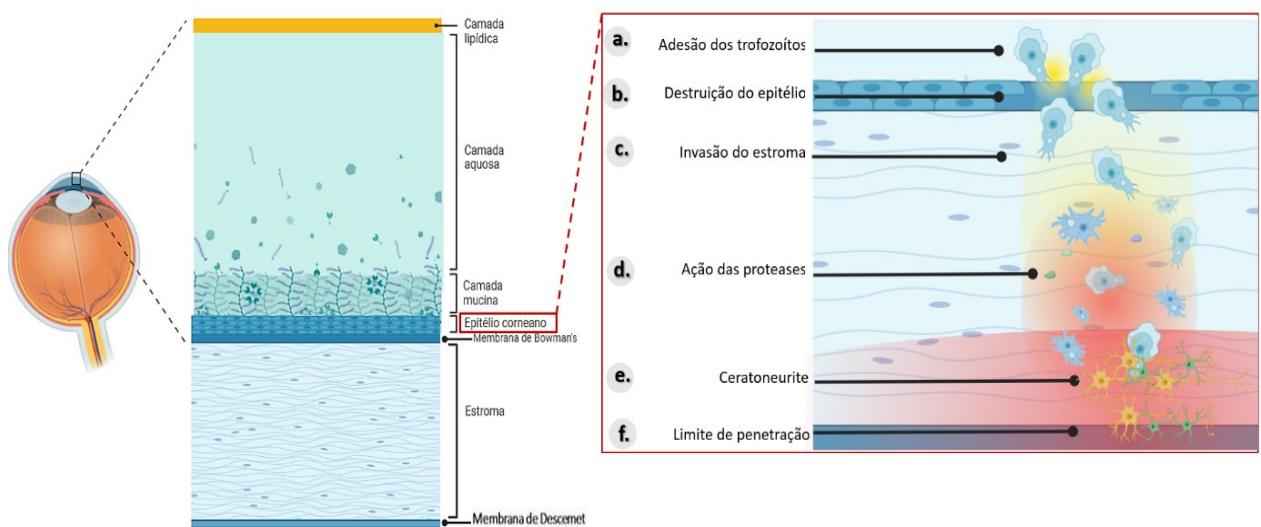
2.3 Ceratite Amebiana

A CA é uma infecção ocular grave, dolorosa e de difícil diagnóstico, no qual o protozoário é capaz, na forma de trofozoíto, de se estabelecer no epitélio lesado e se aprofundar no estroma ocular (DESAI, *et al.*, 2022). Os primeiros relatos sobre a doença aconteceram em 1974 e em 1992 por NAGINTON *et al.*, e JIN *et al.*, e foram associados a traumas decorrentes do uso de lentes de contato. Nos Estados Unidos, a maior incidência de casos ocorreu em 1980, coincidindo com a introdução das lentes gelatinosas no país (ZHANG *et al.*, 2023). A falta de saneamento básico e falhas na desinfecção da água de consumo podem facilitar a proliferação das amebas e a infecção. Na Índia e Paquistão, por exemplo, os casos são predominantemente associados a trauma ocular e contaminação com terra, barro ou água (BHARATHI *et al.*, 2007). No entanto, a maior parte dos casos nas demais regiões do mundo é decorrente do cuidado insuficiente durante o uso das lentes de contato (LAKHUNDI; SIDDIQUI; KHAN, 2017). Aiello *et al.* (2024) realizou um levantamento de estudos e casos de CA entre 1987 a 2022 no mundo, indicando que de 91.951 olhos acometidos por infecções, 5.660 foram ocasionados por *Acanthamoeba* (6,16%). O estudo realizou ainda uma projeção para os próximos anos, apontando a possibilidade de aumento no número de casos de 18,5% até 2053 e 25,5% até 2073, demonstrando a necessidade de um monitoramento da doença (AIELLO *et al.*, 2024). Existem mais de 50 milhões de usuários de lentes nos EUA e até 150 milhões em todo o mundo e a falta de cuidados adequados coloca essa população em risco de infecções oculares. Embora as ceratites bacterianas e fúngicas sejam as mais comuns e *Acanthamoeba* esteja envolvida em 3 a 6% dos casos, a infecção se mostra mais agressiva e com prognósticos obscuros devido a dificuldades no diagnóstico e tratamento (LAKHUNDI; SIDDIQUI; KHAN, 2017). Assim, a prevenção deve levar em conta o cuidado com as lentes, evitando usá-las por tempo acima do recomendado e realizando a higiene com soluções adequadas e nunca com a água de torneira, mesmo que tratada, pois as amebas estão presentes em sistemas de encanamento e caixas d'água (OROZCO, 2021).

As lentes favorecem a menor oxigenação, a alteração do fluxo lacrimal, além de carrearem o protozoário especialmente quando a higienização não é adequada. Na patogenia da CA, inicialmente ocorre o contato das formas ativas, os trofozoítos, com o epitélio da córnea. Ocorre a interação de glicoproteínas dos ceratócitos por

proteínas ligadoras de manose na superfície do trofozoítos (CLARK & NIEDERKORN 2006). Neste processo, os trofozoítos passam a secretar fatores que contribuem para dissolver a matriz extracelular, entre os quais, serinoproteases, cisteíno proteases, elastases e metaloproteases (**Figura 3**). Estas enzimas não somente degradam fibronectina, colágeno tipo I e IV, mas também fibrinogênio, IgG, IgA, albumina e hemoglobina (KONG *et al.*, 2000; CLARK & NIEDERKORN 2006).

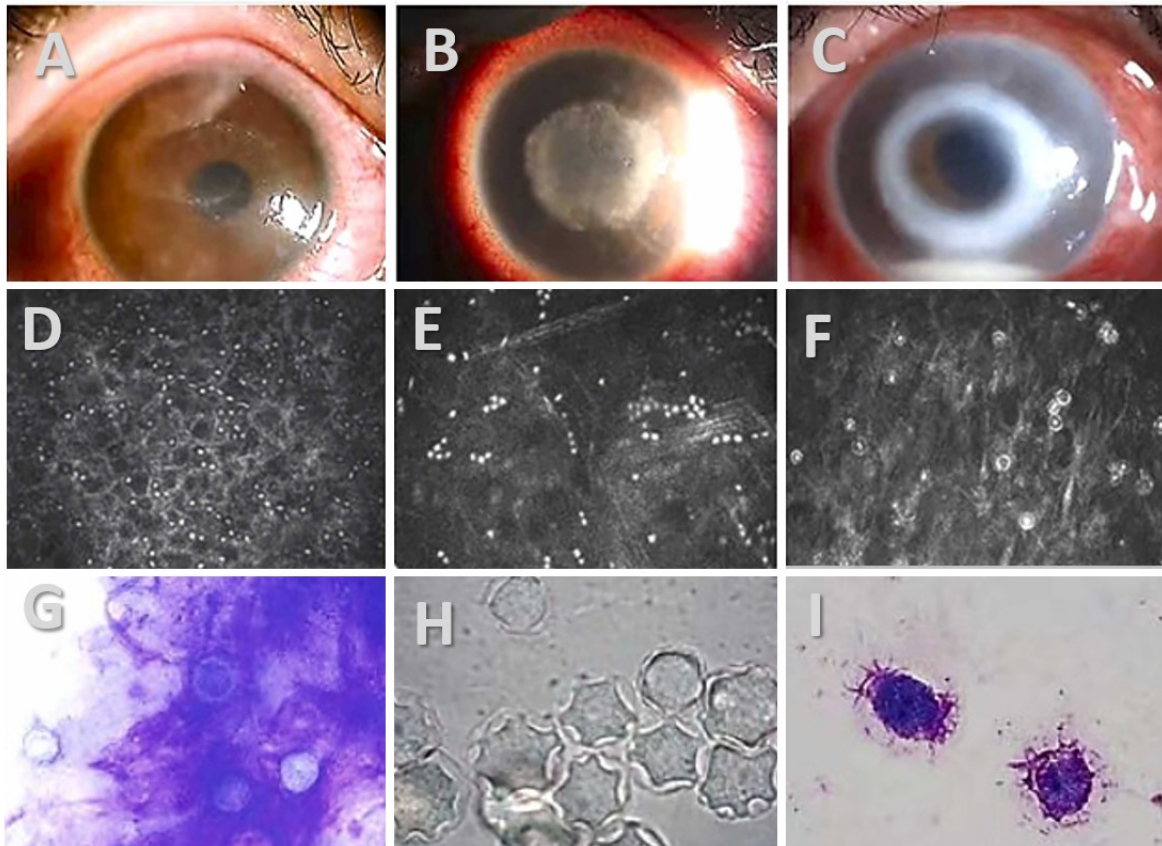
Figura 3 – O processo de invasão da córnea por *Acanthamoeba*



Fonte: Elaborado pela própria autora. Ilustração realizada pelo BioRender de acordo com o descrito por: CLARK e NIEDERKORN, 2006.

Inicialmente as formas de *Acanthamoeba* ficam restritas ao epitélio e causam uma alteração dendritiforme (**Figura 4A**). Com o processo inflamatório e multiplicação do protozoário, ocorre o acometimento do estroma, levando à formação de um infiltrado predominantemente neutrofílico. O tecido se apresenta opaco e esbranquiçado, caracterizando um infiltrado anelar que é observado nas fases mais avançadas da infecção (**Figura 4B, C**). Um agravante é o acometimento da inervação local, gerando uma neurite óptica, que causa dor excruciante ao paciente. Sem o tratamento, a infecção pode progredir para uma ulceração, perda da acuidade visual ou até mesmo a necessidade de transplante ou remoção do globo ocular (**Figura 4**) (Zhang *et al.*, 2023).

Figura 4 – Lesões causadas por Ceratite Amebiana



A. Lesão ocular com presença de pseudodentritos; **B.** lesão com hiperemia ocular; **(C)** Infiltrado em formato de anel; **D-F:** Microscopia confocal mostrando pontos brilhantes representando os cistos; **G.** esfregaço de raspado de córnea, corado por Giemsa e aumento de 1000x, com presença de cistos (seta); **H.** Cistos de parede estrelada obtidos em cultura em ágar não nutritivo com bactérias. **I.** Trofozoítos de cultura corados por Giemsa e aumento de 1000x. Fonte: Adaptado de (Zhang *et al.*, 2023).

A detecção da CA é desafiadora, pois ela pode ser confundida inicialmente com ceratite por Herpes simplex ou se assemelhar com ceratite fúngica em estágios avançados (MORTE *et al.*, 2024). Além disso, o diagnóstico enfrenta diversas limitações, incluindo a demora na suspeita clínica. Os métodos de diagnósticos utilizados incluem a visualização de esfregaço de raspado de córnea por microscopia (**Figura 4G**) e a cultura do raspado de córnea, que é realizada em ágar não nutritivo contendo bactérias como *Escherichia coli* como fonte alimentar (**Figura 4H e I**). Estas técnicas são consideradas padrão ouro, porém sua sensibilidade varia e pode ser muito baixa (FANSELOW *et al.*, 2021), demandando treinamento adequado para obtenção e preparo das amostras. A microscopia confocal in vivo tem alta sensibilidade e taxa de sucesso superior a 90%) (DESAI *et al.*, 2022) (**Figura 4D-F**), porém exige equipamento de maior custo e treinamento

para sua utilização. As técnicas moleculares para detecção do DNA do protozoário no raspado de córnea incluem a PCR convencional e a *rela-time* PCR (YERA *et al.*, 2020; COSTA *et al.*, 2017) são altamente sensíveis, com taxa de sucesso de 84 % a 100% (DESAI *et al.*, 2022).

Devido à dificuldade no diagnóstico e a associação com prognósticos desfavoráveis, o tratamento da CA requer ação imediata após diagnóstico. Os objetivos principais do tratamento são reduzir a carga parasitária, inibir o crescimento do microrganismo e prevenir a perda da visão (KHAN, 2006). Infelizmente, o protozoário possui características de resistência aos medicamentos, devido à sua capacidade de encistamento (YERA *et al.*, 2020). Entre alguns medicamentos utilizados, sabe-se que as biguanidas e diamidinas são antibióticos com a capacidade de destruir a membrana plasmática do trofozoíto quando utilizadas em conjunto, entretanto é necessário que seja utilizado na forma de colírio e administrado de hora em hora nos primeiros dias e com duração mínima de três semanas de forma intensiva, alguns autores recomendam manter o tratamento por meses para reduzir o risco de reinfecções (SEAL, 2003; FANSELOW *et al.*, 2021; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015). O uso de antibióticos combinados como neomicina, propamidina e dibromopropamidina são capazes de atuar nas formas ativas, mas possuem baixa capacidade cisticida (FANSELOW *et al.*, 2021), assim como a anfotericina B e tetraciclina associados a corticoides também são eficazes contra as formas ativas.

Atualmente a abordagem terapêutica deve ser combinada levando em consideração a citotoxicidade dos fármacos para o paciente. Estudos recentes visam outras técnicas, como uso de extrato de plantas e biologia molecular como alvos terapêuticos. Entretanto, devido à resistência do protozoário na sua forma cística, é muito difícil instituir um único tratamento e com eficácia garantida (SIDDIQUI *et al.*, 2016).

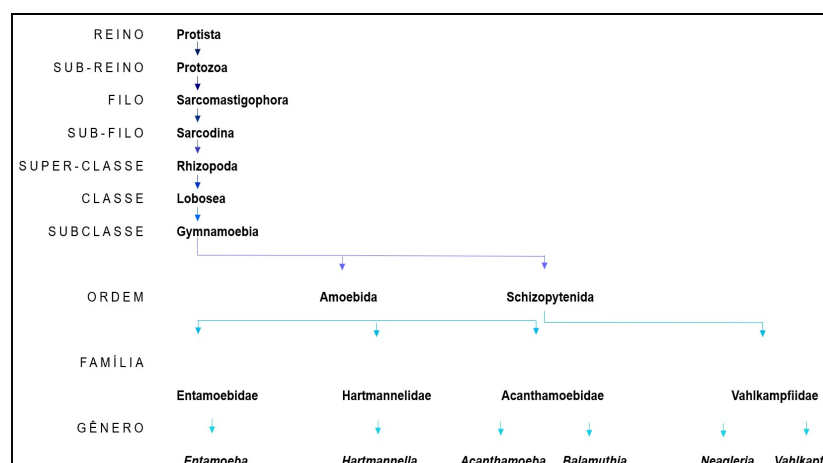
2.4 Histórico e classificação taxonômica do gênero *Acanthamoeba*

As amebas do gênero *Acanthamoeba* foram descritas pela primeira vez em 1930, pelo pesquisador Aldo *Castellani* que isolou um organismo ameboide em culturas de *Cryptococcus* (SIDDIQUI; KHAN, 2012). Na época ele usou a

nomenclatura do gênero *Hartmannella* e seu próprio nome, estabelecendo a espécie *Hartmannella castellanii*. No ano seguinte, em 1931, Volkonsky subdividiu o gênero *Hartmannella* em três subgêneros: *Hartmannella*, *Glaeseria* e *Acanthamoeba*, e duas décadas depois, Singh (1952), começou a questionar a classificação dessas amebas após avaliar diversos isolados. Pussard e Pons (1977), Singh e Das (1970) e Page (1967) reforçaram o questionamento e a denominação *Acanthamoeba* prevaleceu, com base na presença de acantopódios e características dos cistos, consideradas suficientes para caracterizar morfológicamente o gênero. Finalmente em 1988 houve nova adequação na classificação filogenética de protistas ameboides e o gênero *Acanthamoeba* é um dos que figuram na Ordem Amoebida, Classe Lobosea e Filo Sarcomastigophora (**Figura 5**).

Em 1977, Pussard e Pons fizeram um estudo morfológico de diferentes espécies de *Acanthamoeba*. Eles propuseram uma divisão de subgrupos, permitindo categorizar os isolados em grupos I, II, e III, de acordo com o tamanho do cisto e a morfologia do endocisto e ectocisto (PUSSARD, M.; PONS, 1977).

Figura 5 – Classificação filogenética de *Acanthamoeba* em relação às outras amebas de vida livre

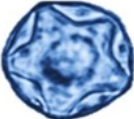
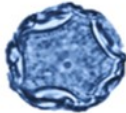



Fonte: Elaborado pela própria autora Ilustração realizada pelo BioRender de acordo com KHAN, 2006.

As espécies do grupo I têm cistos de grande tamanho, com diâmetro acima de 16-18 μm , apresentando características distintivas como a forma estrelada do endocisto e uma parede externa esférica e lisa. As espécies pertencentes ao grupo

II exibem cistos de tamanho médio, inferior a 18 μm , com variações no formato do endocisto, podendo ser estrelado, oval, triangular ou quadrangular. O ectocisto, por sua vez, segue o contorno do endocisto e tipicamente apresenta uma superfície rugosa. O grupo III também apresenta cistos de tamanho menor que 18 μm , de forma redonda ou oval e com fino, liso fracamente ondulado e bem justaposto ao endocisto (**Figura 6**).

Figura 6 – Esquema comparativo da classificação de Pussard e Pons (1977) baseada na morfologia dos cistos, dos 3 diferentes grupos de *Acanthamoeba*.

	Grupo I	Grupo II	Grupo III
DIÂMETRO	16 a 30 μm	\leq a 18 μm	\leq a 18 μm
FORMA DO ENDOCISTO	Aspecto estrelado, braços bem visíveis	Levemente estrelado, oval ou poliédrico	Oval ou levemente angular
FORMA DO ECTOCISTO	Contorno circular, liso ou ondulado	Segue o contorno do Endocisto.	Fino e liso ou fracamente ondulado
FORMA MICROSCÓPICA			

Fonte: Elaborado pela própria autora. Ilustração realizada pelo BioRender de acordo com QVARNSTROM *et al.*, 2006.

Atualmente a morfologia de grupos tem sido empregada principalmente para triagem, uma vez que é de baixo custo e rápida visualização ao microscópio. Para a caracterização das espécies no gênero, Pussard e Pons (1977) utilizaram detalhes da morfologia dos cistos com técnicas de coloração de impregnação pela prata, que não são facilmente reproduzidas. Além disso, estes detalhes morfológicos podem variar de acordo com o cultivo, dificultando a diferenciação. Assim, apesar de mais de 20 espécies de *Acanthamoeba* descritas, atualmente o sistema de genotipagem é mais utilizado. Para isso, é realizado o sequenciamento da subunidade de genes nucleares 18S rRNA (FUERST; BOOTON; CRARY, 2015).

Hoje são descritos 23 genótipos diferentes dentro do gênero *Acanthamoeba*, sendo de T1 a T23 (PUTAPORNTIP *et al.*, 2021). Cada genótipo demonstra pelo menos 5% de divergência genética em relação aos outros genótipos, e há 12 regiões variáveis na região 18S do rRNA, todas as quais devem ser consideradas para a identificação de um novo genótipo (CORSARO, 2010; 2020). Essa classificação genotípica permite associar alguns genótipos a um maior potencial para causar infecções (**Figura 7**). Dos genótipos isolados e caracterizados, o T4 é o mais comumente associado a casos clínicos, provavelmente devido a uma maior virulência (MACIVER *et al.*, 2013).

Figura 7 – Comparativo entre os genótipos de *Acanthamoeba* e as doenças associadas

	CERATITE	ENCEFALITE	AMBIENTAIS
T1		✓	✓
T2	✓	✓	✓
T3	✓		✓
T4	✓	✓	✓
T5	✓	✓	✓
T6	✓		✓
T7	✓		✓
T8			✓
T9	✓		✓
T10	✓	✓	
T11	✓		✓
T12		✓	
T13	✓		✓
T14			✓
T15	✓		✓
T16	✓		✓
T17			✓
T18		✓	✓
T19			✓
T20			✓
T23			✓

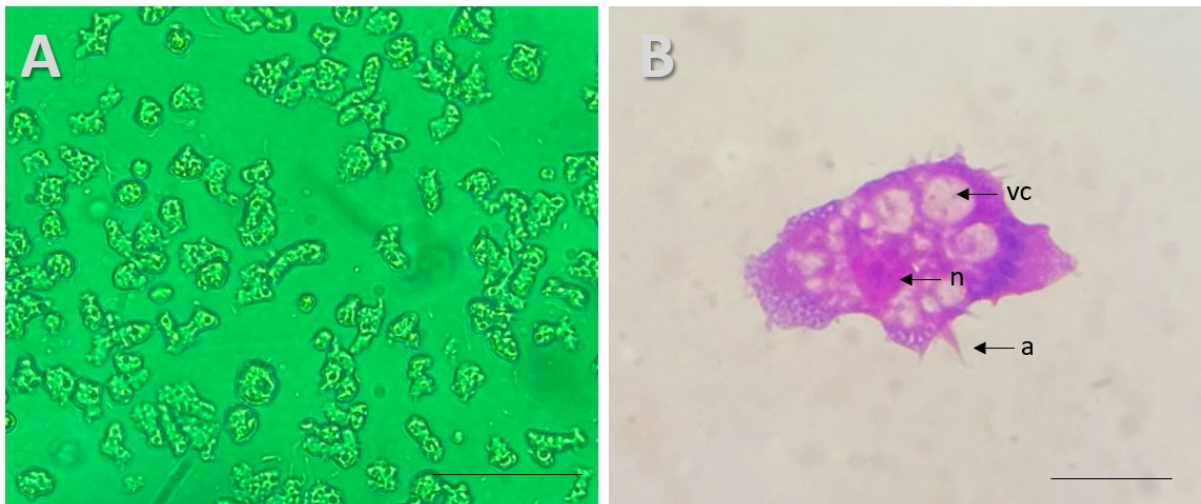
Fonte: Elaborado pela própria autora. Ilustração realizada pelo BioRender com dados de CORSARO, 2020; KALRA *et al.*, 2019 e MACIVER *et al.*, 2013.

2.5 Morfologia e biologia de *Acanthamoeba*

As amebas do gênero *Acanthamoeba* possuem duas formas evolutivas, a primeira são os trofozoítos, estágios ativos metabolicamente, com capacidade locomotora e de multiplicação. Outras formas são os cistos, fase metabolicamente inativa sem capacidade locomotiva e altamente resistentes (SIDDIQUI; KHAN, 2012). Ambas as fases podem ser encontradas nos ambientes e em tecidos infectados.

Os trofozoítos possuem tamanhos variáveis, entre 15 a 40 μm e geralmente têm uma forma irregular e arredondada com pseudópodes (extensões citoplasmáticas) que usam para se mover e capturar alimentos. Os típicos acantopódios, pseudópodes afilados, dão nome ao gênero. Os trofozoítos possuem um citoplasma granuloso, núcleo descentralizado e vacúolos que desempenham um papel na digestão intracelular e no transporte de nutrientes (**Figura 8**) (POSSAMAI, 2018). Também apresentam um ou mais vacúolos contráteis que atuam na regulação osmótica (SIDDIQUI; KHAN, 2012).

Figura 8 – Trofozoítos de *Acanthamoeba* provenientes de cultura em meio PYG



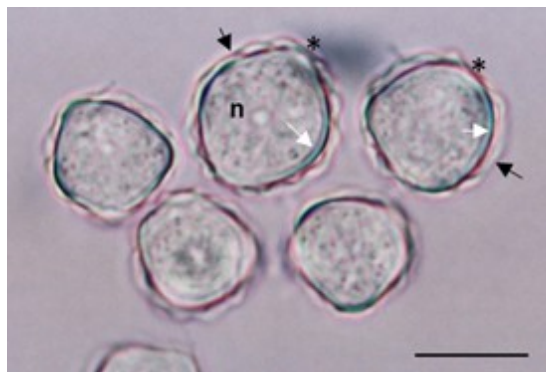
Cultura axênica de trofozoítos, visualizada em microscópio invertido de campo claro (barra: 50 μm) (**A**). Trofozoíto corado por Giemsa (**B**), mostrando (**a**) acantopódios (seta); (**n**) núcleo (seta); (**vc**) vacúolo (seta). Corados pela coloração de hematoxilina e eosina (barra: 10 μm). Fonte: Arquivo pessoal.

Sua forma de multiplicação é assexuada por fissão binária e sua alimentação é através de fagocitose, principalmente de bactérias, fungos, leveduras e algas (LORENZO-MORALEZ *et al.*, 2015). Os trofozoítos de *Acanthamoeba*

sobrevivem em ambientes em que haja umidade e fonte alimentar e apresentam um metabolismo aeróbio. Podem ser facilmente cultivados em placas de meio semissólido, como o ágar não nutriente, crescendo em abundância se suplementado com bactérias como *Escherichia coli* ou *Enterobacter*, vivas ou inativadas (SCHUSTER, 2002). Também podem ser cultivados axenicamente e o meio proteose-peptona extrato de levedo e glicose é o mais utilizado para esta finalidade (SCHUSTER, 2002).

Os cistos de *Acanthamoeba* possuem diâmetro entre 10 a 18 μm , formato arredondado e uma parede cística externa rígida e espessa, que tem aspecto duplo e que confere maior proteção (**Figura 9**) (SIDDIQUI; KHAN., 2012). Apresentam na superfície ostíolos, que são poros recobertos por uma camada mucosa chamada opérculo, onde o ecto e endocisto se encontram formando uma estrutura menos espessa que as demais partes do cisto (PAGE, 1988; SCHUSTER 2004; KHAN, 2006). O estímulo ao encistamento pode ocorrer naturalmente quando há mudanças bruscas de temperatura, pH, redução na fonte de nutrientes no ambiente ou, no caso humano, em contato com agentes terapêuticos.

Figura 9 – Cistos de *Acanthamoeba* em cultura



Cistos formados em meio ágar não nutriente. Seta preta: ectocisto; seta branca: endocisto; n: núcleo; asterisco: região do ostíolo (barra: 10 μm). Fonte: arquivo pessoal, Profa. Adriana O Costa.

Em ambiente laboratorial, o trofozoíto pode ser induzido a encistar *in vitro* a partir de estímulos como remoção de nutrientes, adição de íons magnésio, hiperosmolaridade usando glicose ou aumento de temperatura e pH (AQEEL *et al.*, 2013). Ocorre uma modificação no metabolismo celular, diminuição da massa citoplasmática, desidratação e síntese de uma parede dupla de proteção, com a

camada externa composta por proteínas e a interna por celulose (ANWAR; KHAN; SIDDIQUI, 2018). Estudos morfológicos do encistamento indicam que inicialmente é formado o ectocisto externo e depois ocorre a deposição de carboidratos complexos formando o endocistos (CHÁVEZ-MUNGUÍA *et al.*, 2005).

Os ostíolos parecem atuar como sensores, com capacidade de captar variações do ambiente (KHAN, 2006). Quando o cisto é exposto a condições ideais, ocorre o estímulo ao desencistamento, no qual sua parede se separa completamente do trofozoíto, tornando-o novamente ativo (KHAN, 2006).

Uma complexidade da *Acanthamoeba* é a sua capacidade de alternar entre as duas formas de vida para sobreviver a adversidade do ambiente, inclusive resistindo à defesa do hospedeiro, podendo permanecer em um estado inativo nos tecidos da córnea por até 31 meses com risco de resultar em recidiva da ceratite (NIEDERKORN, 2021). Além disso, os cistos são mais resistentes à terapia amebicida, devido a sua dupla parede (ectocisto e endocisto), essa característica dificulta o tratamento e se torna um grande problema no manejo das infecções, uma vez que os compostos não conseguem penetrar com eficácia.

Nesse contexto, estudos sobre vesículas extracelulares (VEs) têm ganhado destaque nos últimos anos, uma vez que essas estruturas, liberadas por parasitas patogênicos, apresentam a capacidade de interagir com células do hospedeiro e com os parasitas presentes no meio, potencialmente influenciando mecanismos de resistência e sobrevivência, o que pode incluir a regulação da formação e manutenção dos cistos (ZHANG *et al.*, 2024).

2.6 Vesículas extracelulares (VEs)

Vesículas extracelulares (VEs) corresponde a um termo genérico para designar partículas encapsuladas em uma bicamada lipídica que são liberadas por células eucariotas, procarióticas e organismos pluricelulares. Por possuírem uma alta heterogeneidade molecular e estrutural, estão sendo foco de diversos estudos que exploram sua composição e seus efeitos com outras células (TORRECILHAS *et al.*, 2020).

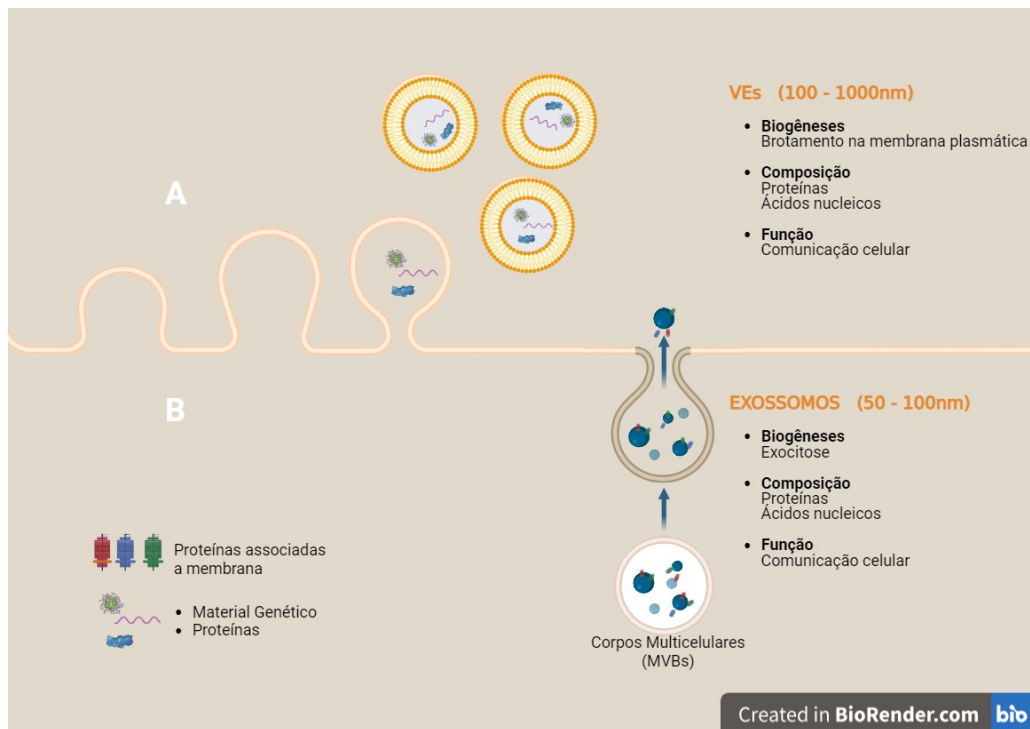
Os primeiros relatos sobre vesículas foram feitos em 1969, em que VEs presentes fora do tecido cartilaginoso foram identificadas (COUCH *et al.*, 2021). Em

1983, Harding e colaboradores conseguiram, pela primeira vez, comprovar a liberação de vesículas pelas células, nomeando-as como exossomos. Por meio de estudos destes autores, foi possível provar que os reticulócitos perderam os receptores de ferritina através de exossomos liberados no meio externo (COUCH *et al.*, 2021). Outros pesquisadores da época conseguiram observar que VEs de células tumorais eram liberadas por vias complexas, através de endossomos multicelulares e através de brotamento na membrana. No final da década de 80, as VEs foram deixadas de lado após acreditar-se que seriam apenas via de excreção de produtos indesejados pelas células. No entanto, na contramão desse entendimento, Raposo *et al.* (1996) e Zitvogel *et al.* (1998) confirmaram que as VEs poderiam sim atuar como mediadores da resposta imune, o que impulsionou novas pesquisas respeito da ação de VEs tumorais (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014).

Até recentemente as VEs eram agrupadas de acordo com a sua formação na célula, sendo elas: (1) microvesículas, possuindo tamanho de 100 nanômetros a 1 micrômetro, que surgem quando a membrana da célula se dobra para criar pequenas bolhas; (2) exossomos, que têm entre 30 e 150 nanômetros e são produzidas dentro de corpos multivesiculares (MVBs) no citoplasma, sendo então liberadas; (3) corpos apoptóticos, que têm um tamanho de 1 a 5 micrômetros e se formam durante a morte celular (THÉRY *et al.*, 2006). Por algum tempo, o uso de termos como "exosome-like vesicles" e micropartículas foi adotado pelos autores da área (LIN *et al.*, 2019; MARCILLA *et al.*, 2014; ZAMANIAN *et al.*, 2015; COLTEL *et al.*, 2006) "Exosome-like" é uma terminologia que sugere, porém não confirma se a origem é endocítica, ou seja, se as VEs seriam liberadas após a fusão de corpos multivesiculares com a membrana (**Figura 10**).

Atualmente, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) publica anualmente um manual com informações mínimas sobre VEs, com o objetivo de orientar e facilitar o estudo dessas estruturas, dada sua crescente importância na pesquisa (ZHANG *et al.*, 2024), além de atualizar os termos a serem adotados nesta área de pesquisa. Desta forma, após última atualização realizada em 2023 ((WELSH *et al.*, 2024), a ISEV desaconselha o uso de termos específicos sem o conhecimento claro da origem das vesículas, recomendando o uso do termo genérico vesículas extracelulares (VEs).

Figura 10 – Liberação de Vesículas e Exossomos



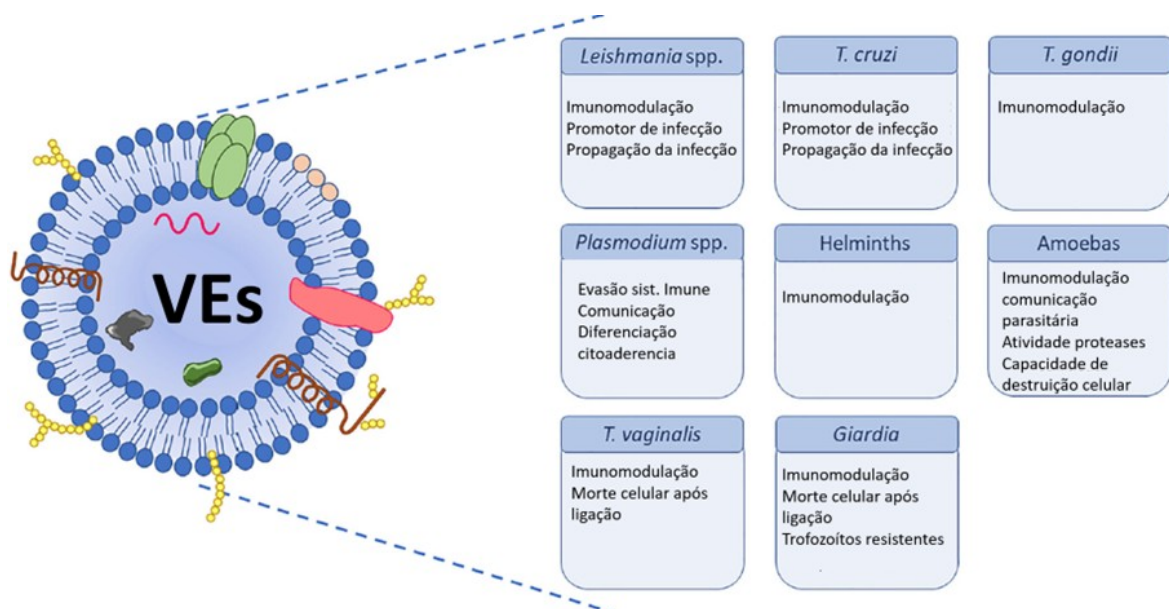
VEs são liberadas por brotamento da membrana plasmática (**A**). Os exossomos são formados no interior de corpos multivesiculares (MVBs) e são liberados pela fusão de MVBs com a membrana plasmática (**B**). Fonte: Elaborado pela própria autora. Ilustração realizada pelo BioRender.

Apesar de não possuírem capacidade de replicação e núcleo funcional, as VEs podem exibir proteínas e receptores em sua superfície, enquanto seu interior contém uma diversidade de elementos, como enzimas, fatores de transcrição, RNAs, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e açúcares. São encontradas abundantemente em diferentes fluidos biológicos e possuem como principal função a comunicação intercelular através da liberação das suas moléculas, podendo ser tanto do hospedeiro quanto derivadas de patógenos (CAVALCANTE *et al.*, 2021). As VEs apresentam *lipid rafts*, que são pequenos domínios de membrana compostos por colesterol e esfingolipídios.

Acredita-se que a composição de sua superfície possibilita a interação e transdução de sinais, além de permitir a apresentação de antígenos (GONÇALVES *et al.*, 2018). Assim, além de a comunicação intercelular mediada por VEs ocorrer entre a própria espécie, a sinalização ocorre entre espécies diferentes (células doadoras e células alvo), com mecanismos variados nos processos

fisiológicos e fisiopatológicos. Em parasitas, vários estudos mostram a atuação das VEs na interação com o hospedeiro (**Figura 11**). (TORRECILHAS *et al.*, 2020). Por exemplo, em um estudo realizado com *Trypanosoma brucei*, agente da doença do sono, os autores mostraram que as VEs do parasito foram capazes de se fundir com eritrócitos de mamíferos e transferir proteínas e lipídeos para esta célula do hospedeiro. Essas modificações favorecem a fagocitose desses eritrócitos alterados, o que agrava quadro de anemia durante a infecção ativa (SZEMPRUCH *et al.*, 2016). Também Mantel e colaboradores, em um estudo com Malária, demonstraram que hemácias infectadas por *P. falciparum* liberam VEs que possuem antígenos provenientes do parasito e que são altamente imunogênicos, promovendo a ativação de macrófagos e migração de neutrófilos. As VEs produzidas pelo parasito, portanto, além de serem incorporadas pelas hemácias, são posteriormente liberadas por elas para induzir uma resposta imune ainda maior do corpo na tentativa de combate à doença (MANTEL *et al.*, 2013).

Figura 11 – Demonstração de VEs de diferentes parasitos, com suas respectivas ações dependendo da espécie ou da forma evolutiva.



Fonte: Elaborado pela própria autora. Ilustração realizada pelo BioRender. Adaptado de Fernandez-Becerra *et al.*, 2023.

Assim como estes protozoários descritos na Figura 11, as amebas do gênero *Acanthamoeba* também secretam VEs, conforme mostrado por alguns estudos

recentes (SIERRA-LOPEZ *et al.*, 2023; COSTA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2018; RETANA-MOREIRA *et al.*, LIN *et al.*, 2019). Em comum, estes estudos apontam para um perfil de produção de VEs de 100 a 235 nm e que estas carregam proteases para o meio externo. Além disso, as VEs de *Acanthamoeba* têm capacidade citotóxica (GONÇALVES *et al.*, 2018), e atuam na ativação da resposta imune inata, (LIN *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2021). Em ensaios de ativação de macrófagos murinos, as VEs induziram a produção de óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) de forma cepa dependente, com cepa de menor potencial patogênico apresentando perfil mais pró-inflamatório do que as consideradas patogênicas (COSTA *et al.*, 2021).

Estes dados confirmam que as VEs de *Acanthamoeba* afetam a relação com o hospedeiro, estimulando estudos adicionais sobre seu papel funcional e possíveis aplicações no campo diagnóstico e terapêutico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Caracterizar VEs de trofozoítos em fases de encistamento comparativamente a de trofozoítos ativos, avaliando o papel funcional dessas diferentes populações no ciclo celular de *Acanthamoeba*

3.2 Objetivos Específicos:

- Obter e purificar populações de VEs derivadas trofozoítos em encistamento precoce, encistamento tardio e trofozoítos ativos.
- Caracterizar comparativamente as diferentes populações de VEs por microscopia eletrônica, *Nanotracking particle analysis* (NTA) e conteúdo proteico.
- Avaliar o perfil zimográfico das diferentes populações de VEs
- Avaliar o efeito das VEs de diferentes populações na multiplicação, no encistamento e no desencistamento de *Acanthamoeba*.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultivo de *Acanthamoeba*

Para este estudo, foi utilizado o isolado ALX de *Acanthamoeba castellanii*, obtido de um caso clínico de ceratite amebiana em 2006, na cidade Vitória, Espírito Santo, Brasil. Essa amostra pertence ao grupo morfológico II e genótipo T4 (DUARTE *et al.*, 2013).

A cultura foi mantida sob condições axênicas a 32° C, em meio PYG (Proteose peptona extrato de levedo e glicose) contendo 5% de soro bovino fetal e antibiótico enrofloxacino 10µg/mL (COSTA *et al.*, 2021). Os repiques foram realizados a cada 72 horas para manutenção, em 5 mL de meio contido em tubo cônico de 15 mL, transferindo-se cerca de 200 µL para meio fresco à cada passagem. Para os ensaios, as culturas foram transferidas para garrafas de área 25 cm² contendo 10 mL de meio ou de 75cm² com 20 mL de meio, sendo utilizadas após 48 a 72 horas de crescimento

4.2 Vesiculação

4.2.1 Trofozoítos em encistamento

Trofozoítos em fase exponencial de crescimento foram recuperados de culturas após banho de gelo por 10 minutos e centrifugação da suspensão em tubos cônicos de 15 mL. Os trofozoítos foram quantificados e sua viabilidade analisada em câmara de Neubauer, por coloração com azul de tripan 0,25% (1:1) e em seguida, foram lavados três vezes por centrifugação (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente) em Salina de Page (2,5 mM de NaCl, 1 mM de KH₂PO₄, 0,5 mM de Na₂HPO₄, 40 mM de CaCl₂ e 20 mM de MgSO₄) (PAGE, 1988), para remover o meio PYG e resquícios de soro bovino fetal. O sedimento foi transferido para salina de encistamento de NEFF (95 mM de NaCl, 100 mM de KCl, 0,01 mM de Na₂HPO₄, 8 mM de MgSO₄, 0,4 mM de CaCl₂, 1 mM NaHCO₃, and 20 mM de Tris-HCl, pH 9.0) na concentração de 10⁶ formas/mL, em tubos cônicos de 50 mL. Os tubos foram mantidos a 32° C sob agitação (180rpm) por 4 horas, quando então foram centrifugados para remover as formas de *Acanthamoeba* (400 x g, 10 minutos) e o

seu sobrenadante reservado para separação das VEs em encistamento precoce (EP). O sedimento com trofozoítos foi transferido para um tubo novo, contendo 30 mL de salina de encistamento de NEFF para repetição do processo de vesiculação, porém a recuperação do sobrenadante foi realizada após 20h, totalizando 24 horas, para obter VEs em encistamento tardio (ET).

4.2.2 Trofozoítos ativos

As VEs de trofozoítos ativos (TA) foram obtidas da mesma forma que descrito em Costa *et al.*, (2021). Resumidamente, os trofozoítos quantificados e lavados em salina de Page como no item 4.2.1, foram transferidos para 30 mL de meio RPMI em tubo cônico de 50 mL, na concentração média de 10^6 formas/mL) e incubados a 32° C por 2h, sob agitação a 180rpm.

4.3 Isolamento das vesículas extracelulares

O sobrenadante coletado dos ensaios de vesiculação (item 4.2) foram submetidos a centrifugações sequenciais para remover partículas celulares e separar as VEs de interesse, conforme procedimentos de Costa *et al.*, (2021). Em resumo, o sobrenadante do processo de vesiculação foi filtrado em membrana de 0,22 μ m (Millipore®) e as amostras foram distribuídas em oito tubos em proporções iguais, para ultracentrifugação 100.000g por 120 minutos a 4°C, utilizando a ultracentrífuga Beckman Coulter, Inc. (Departamento de Bioquímica-ICB/UFMG). Após a ultracentrifugação, o sedimento resultante foi reunido em 200 μ L de solução salina tamponada (PBS) e separado em duas alíquotas de 100 μ L em microtubos. As amostras foram armazenadas em freezer -80° C até a sua utilização.

Essa metodologia permitiu a obtenção de populações de VEs provenientes de trofozoítos em encistamento (4 horas, denominadas EP), encistamento tardio (24 horas, denominadas ET) e de trofozoítos ativos (denominadas TA).

4.4 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

As VEs coletadas de trofozoítos em processo de encistamento precoce e tardio (EP e ET) e ativos (TA) foram submetidas à caracterização por *Nanotracking*

particle analysis (NTA), disponibilizado no Departamento de Fisiologia e Biofísica, com a colaboração do Prof. Frederic Jean Georges Frezard. A tecnologia do NTA é baseada no fluxo de luz e no movimento Browniano para obter informações sobre a distribuição, tamanho e concentração das partículas a partir de um feixe de luz e a sua refração da suspensão inserida no analisador.

Para as análises, as amostras foram diluídas em PBS esterilizado numa proporção de 1:1000. Cada amostra foi analisada por vídeos com duração de 60 segundos, em cinco repetições. Todas as avaliações foram realizadas utilizando o software NTA (versão 3.0).

4.5 Quantificação proteica

Com intuito de identificar a concentração de proteínas presentes nas amostras de VEs, foi utilizado o *kit QuantiPro BCA Assay*, fabricante Sigma®. Uma alíquota de 10µL de cada amostra das vesículas EP, ET e TA, foi transferida para uma placa de 96 poços, em duplicata. Para a elaboração da curva padrão foram preparadas soluções de BCA com concentrações conhecidas, que serviram como padrões para a curva de calibração, nas seguintes concentrações: 0µg/mL, 0,5µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 30µg/mL. Nas 2 primeiras colunas da placa foram adicionados os padrões e nas colunas seguintes as amostras em duplicata, no qual foram adicionados 150µL de solução de reagente A, seguidos pela adição de 150µL de solução de reagente B e 3 µL da solução C. Posteriormente, 10µL de cada amostra diluída em 90 µL de PBS foram adicionados aos respectivos poços. A placa foi incubada em temperatura de 60°C por 60 minutos, conforme especificado pelo fabricante. Após a incubação, a absorbância foi medida em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 562nm. Com base na curva padrão, a concentração de proteína nas amostras das VEs foi determinada a partir dos valores de absorbância obtidas.

4.6 Microscopia eletrônica

Para visualizar as formas de trofozoítos ativos, trofozoítos em processo de encistamento precoce (4h) e tardio (24h) liberando VEs, a microscopia eletrônica de

varredura foi empregada. As formas nas diferentes fases foram lavadas por centrifugação em salina de Page (400 xg, 10 minutos) e fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, contendo sacarose a 0,146 M e CaCl_2 a 5 mM, à temperatura ambiente por 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, desidratados em etanol e incorporados em Epon. A visualização foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura - FEI Quanta 200 FEG.

Para visualização das VEs isoladas, a microscopia de transmissão com contrastação negativa foi realizada. As amostras de VEs obtidas da ultracentrifugação em PBS pH 7,2. Em seguida, essas amostras foram encaminhadas ao Centro de Microscopia da UFMG para processamento. Resumidamente, as amostras foram aderidas em uma tela de cobre conforme protocolo interno - IT P BIO 027 (Centro de Microscopia da UFMG) e foram submetidas a contrastação secundária com Acetato de uranila. As imagens foram visualizadas pelo microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - FEI SpiritBiotwin 120 kV.

Todo o preparo e obtenção de imagens foram realizados no Centro de Microscopia da UFMG.

4.7 Zimografia

Os ensaios de zimografia, com protocolos descritos por Alfieri *et al.*, (2000), foram adaptados com modificações para caracterizar a atividade de protease das amostras de VEs, conforme Costa *et al.*, (2021). Para isso, as amostras contendo 10 μg de proteína (em volumes de 25 μL) foram adicionadas em gel de poli-acrilamida a 10%, contendo gelatina a 0,1% como substrato. Para realizar uma caracterização parcial das proteases, replicatas das amostras foram pré-incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente com inibidores de protease ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 50mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) a 1mM e E64 a 10mM, inibidores de metalo, serina e cisteína proteases, respectivamente. Para estabelecer os controles negativos, amostras de salina de encistamento de NEFF e RPMI sem trofozoítos, submetidas às mesmas condições dos protocolos de vesiculação, foram utilizadas. Cinco microlitros do sobrenadante da última etapa de ultracentrifugação

também foi usada como controle negativo do processo de purificação de VEs. O padrão de massa molecular *BIORAD Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards* foi utilizado na primeira canaleta.

A corrida foi conduzida por 2 horas a uma voltagem de 15 mA, em pH 7,4 (tampão Tris HCl/SDS 1,5 mM). O gel passou por uma incubação de três horas em Coomassie Brilliant Blue para a coloração. Em seguida, foi submetido a um procedimento de descoloração em três etapas sequenciais (com durações de 15, 30 e 60 minutos), empregando uma solução descolorante composta por metanol (30%) e ácido acético (10%). As áreas de digestão foram reconhecidas como regiões descoradas.

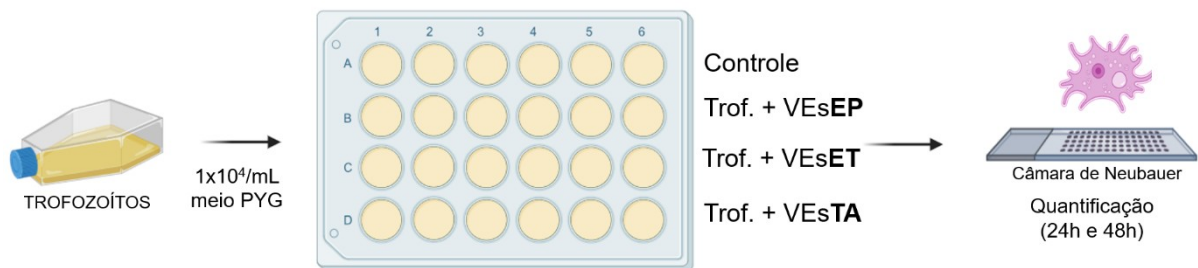
4.8 Efeito das VEs na multiplicação de *Acanthamoeba*

Para avaliar os efeitos das VEs na multiplicação dos trofozoítos, inicialmente uma curva de crescimento foi estabelecida e com isso, indicar os tempos ideais de quantificar as formas no ensaio de efeito da adição de VEs exógenas sobre o desenvolvimento das formas. Para isso, os trofozoítos cultivados em PYG foram quantificados em câmara de Neubauer e sua concentração ajustada para 1×10^4 trofozoítos/mL em meio PYG. Quinhentos microlitros desta suspensão foram distribuídos em placas de 24 poços, em triplicata e a placa foi incubada a temperatura ambiente (25 C°), sob agitação horizontal. À cada 12 h, até 72h, a quantificação das formas foi realizada removendo-se 10 uL de cada poço após homogeneização para contagem em câmara de Neubauer.

A partir da análise da curva, os tempos de 24h e 48h foram determinados para avaliar o efeito de VEs exógenas no crescimento. Para isso, a placa de 24 poços foi usada em um ensaio da seguinte maneira: (1) Controle (trofozoítos sem VEs), (2) trofozoítos + vesículas de encistamento precoce (EP), (3) trofozoítos + vesículas de encistamento tardio (ET), (4) trofozoítos + vesículas de trofozoítos ativos (TA) (**Figura 12**). A concentração de VEs em cada poço foi estimada de forma a proporcionar cerca de 10^4 VEs/trofozoíto, equivalendo a 4,4 µg de proteínas de VEs por poço, em volume máximo adicionados de 500uL. Os pontos da curva de crescimento para análise do estudo foram às 24h e 48h, quando foi feita a quantificação de trofozoítos em Câmara de Neubauer (**Figura 12**). Durante as

contagens microscópicas, porém, foi observada uma pequena quantidade de cistos maduros, com presença de membrana dupla, que também foram quantificados.

Figura 12 – Esquema experimental do ensaio de adição de vesículas extracelulares (VEs) exógenas a cultura de trofozoítos de *Acanthamoeba*



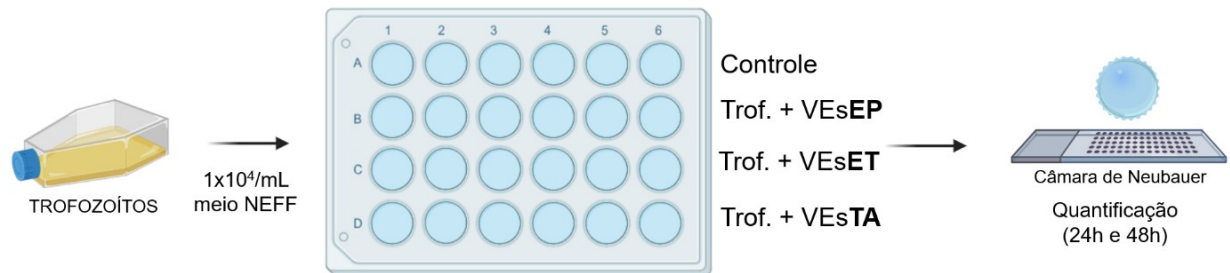
Os trofozoítos foram distribuídos nos poços em volume final de 500 μL , na ausência e presença de VEs derivadas de trofozoítos em encistamento precoce (EP), tardio (ET) e de trofozoítos ativos (TA) no meio PYG. Elaborado pela própria autora. Ilustração realizada pelo BioRender.

4.9 Efeito das VEs no encistamento de *Acanthamoeba*

Para investigar se VEs apresentam efeito no encistamento de *Acanthamoeba*, inicialmente a cinética de encistamento foi avaliada, realizando a contagem diária de cistos, a partir de trofozoítos transferidos para salina de encistamento de NEFF. Os trofozoítos obtidos de meio PYG foram lavados 3 vezes em salina de NEFF, quantificados em câmara de Neubauer e ajustados para 10^4 formas/ mL. A curva foi realizada em placa de 24 poços, com volume de 500 μL por poço, em triplicata. Os cistos maduros (com membrana cística dupla) foram quantificados de 12 em 12h até 60h, removendo-se 10 μL de cada poço.

Da mesma forma que no item 4.8, escolheu-se os tempos de 24h e 48h para o ensaio de adição de vesículas exógenas (4,4 μg por poço) (**Figura 13**). A contagem de cistos, na presença das diferentes populações de VEs e em um controle sem VEs no meio NEFF foi realizada conforme descrito naquele item.

Figura 13 – Esquema experimental do ensaio de adição de vesículas extracelulares (VEs) a cultura de *Acanthamoeba* em encistamento

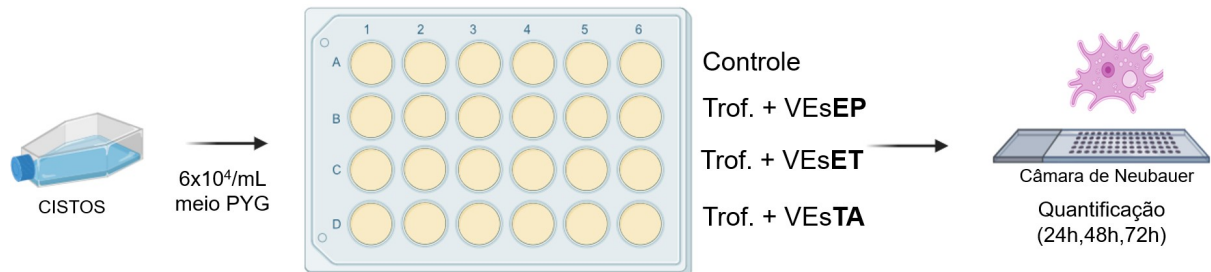


Os trofozoítos foram distribuídos nos poços em volume final de 500 μL , na ausência e presença de VEs exógenas derivadas de trofozoítos em encistamento precoce (EP), tardio (ET) e de trofozoítos ativos (TA) em salina de encistamento de NEFF. Elaborado pela própria autora. Ilustração realizada pelo BioRender

4.10 Efeito das VEs no desencistamento de *Acanthamoeba*

Para avaliar o efeito das VEs no desencistamento dos trofozoítos, a cinética de desencistamento foi investigada na presença e ausência de VEs. Para isso, cistos maduros foram produzidos em salina de encistamento de NEFF após duas semanas sob agitação em temperatura ambiente. Os cistos foram concentrados por centrifugação e mantidos por 5 minutos em solução de SDS 0,5% para lise de trofozoítos remanescentes e pré-cistos. Após nova lavagem por centrifugação para remoção do SDS, os cistos foram suspensos em meio PYG, quantificados em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 6×10^4 /mL. Quinhentos microlitros da suspensão foram distribuídos nas placas de 24 poços, em triplicata. As VEs foram adicionadas conforme item 4.8 (4,4 μg proteínas de VEs por poço), mantendo-se amostras controle sem VEs. A placa foi incubada a temperatura ambiente (25C°) e nos tempos 24h, 48h e 72h, a quantificação dos trofozoítos foi realizada removendo-se 10 μL de cada poço, após homogeneização para contagem em câmara de Neubauer (**Figura 14**).

Figura 14 – Esquema experimental do ensaio de adição de vesículas extracelulares (VEs) exógenas a cultura de cistos de *Acanthamoeba*, para avaliação de desencistamento



Os cistos foram distribuídos nos poços em volume final de 500 μL , na ausência e presença de VEs derivadas de trofozoítos em encistamento precoce (EP), tardio (ET) e de trofozoítos ativos (TA) no meio PYG. Elaborado pela própria autora. Ilustração realizada pelo BioRender.

4.11 Análises estatísticas

Toda a análise estatística foi realizada utilizando o software Prisma 8.0, aplicando o teste t para comparar as médias e os dados brutos obtidos. Primeiramente, utilizamos o teste para padronizar o cultivo, avaliando a viabilidade celular e a contagem de amebas/mL. Em seguida, a análise estatística foi aplicada para comparar as concentrações de partículas/mL, o tamanho médio e modal das diferentes populações de vesículas extracelulares (VEs) obtidas através da técnica de NTA e quantificação proteica BCA. Além disso, o teste t foi usado nos ensaios de adição de VEs para comparar as quantidades de trofozoítos e cistos entre os grupos tratados com VEs e os controles sem VEs. Para todas as análises, adotamos um nível de significância de $p < 0,05$, garantindo a identificação de diferenças importantes entre as condições avaliadas.

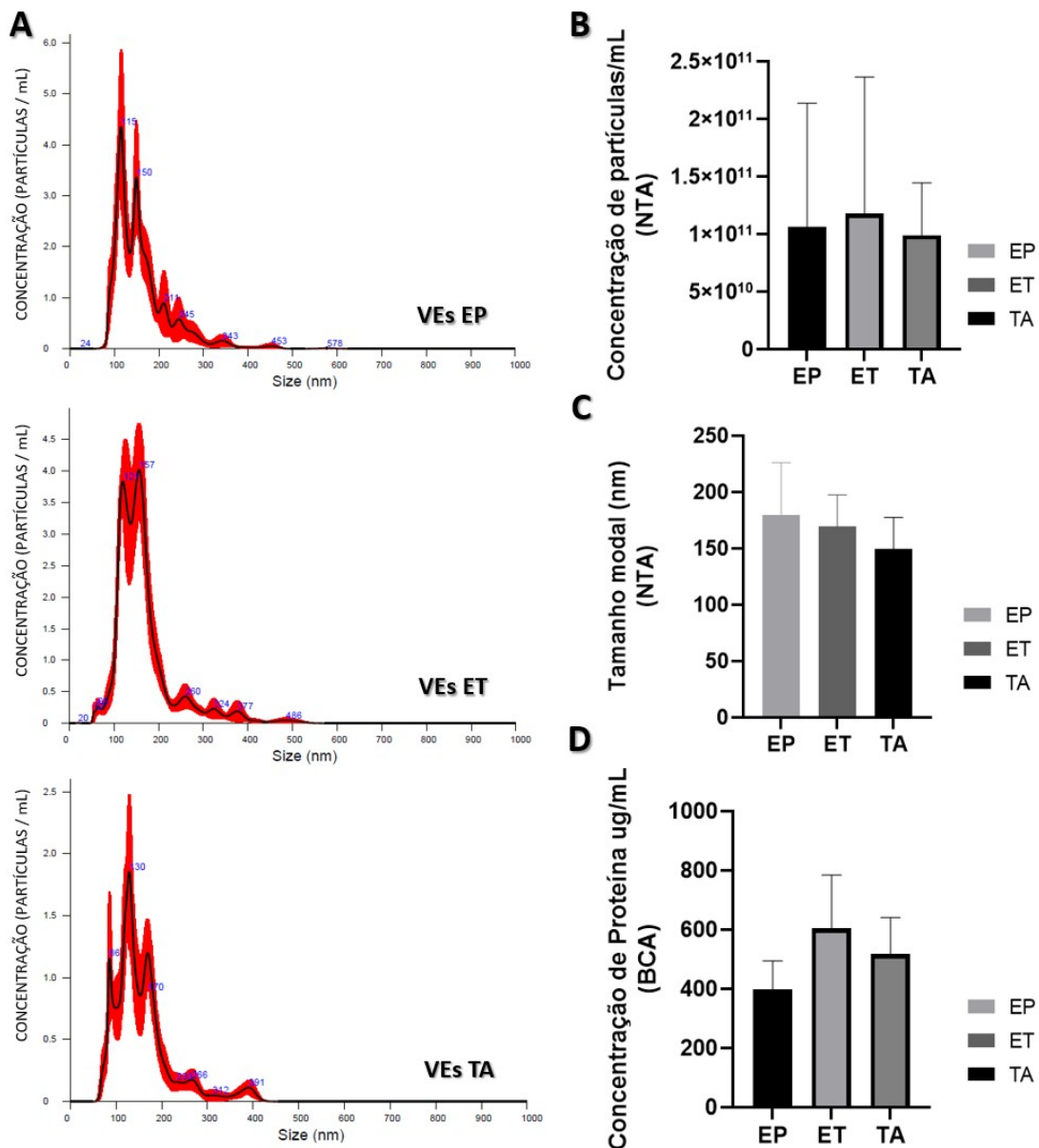
5 RESULTADOS

5.1 Diferentes formas evolutivas de *Acanthamoeba* produzem VEs com características biofísicas similares

A análise por *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) de VEs em encistamento, nos tempos precoce e tardio e VEs de trofozoítos ativos indicou um perfil homogêneo, predominantemente na faixa de tamanhos entre 100 a 200 nm (**Figura 15A**) e concentrações variando entre $1,5 \times 10^{11}$ a $3,55 \times 10^{11}$ partículas/mL (**Figura**

15B). O tamanho modal das VEs em encistamento precoce e tardio e de trofozoítos ativos é demonstrado na (**Figura 15C**), com um valor médio de 129,8 nm, 134,2 nm e 184,0 nm, respectivamente. A análise de concentração proteica dosada por BCA indicou valor médio de 496,5ug/mL de proteínas totais, também sem diferenças entre as populações de VEs ($p=0,65$) (**Figura 15D**).

Figura 15 – Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) de *Acanthamoeba* obtidas de formas em encistamento e de formas ativas



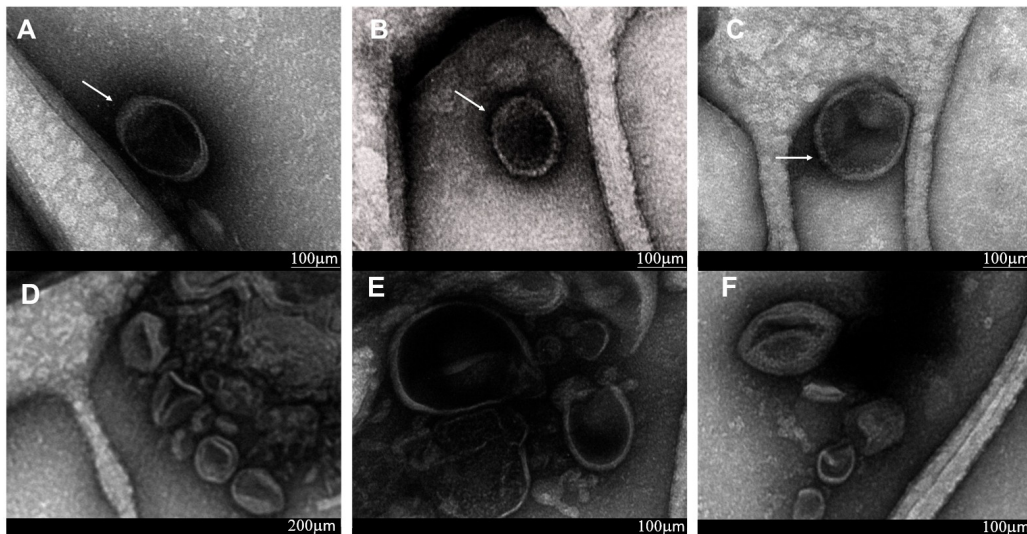
(A) gráfico obtido da análise de rastreamento de nanopartículas (Nanotracking particle analysis - NTA) de VEs derivadas de trofozoítos em encistamento precoce (EP), encistamento tardio (ET) e trofozoítos ativos (TA). As linhas vermelhas indicam o desvio padrão referentes a concentração das partículas e as áreas dos picos indicam o tamanho das partículas predominante em nanômetros. (B) concentração de partículas/mL nas populações EP, ET e TA (N: 6 amostras para cada grupo). (C) tamanho modal médio das partículas das populações EP, ET e TA (N: 6 amostras para cada grupo).

(D) representação gráfica da quantidade de proteína encontrada em cada protocolo pela técnica de BCA (N: 6 amostras para cada grupo).

5.2 VEs de trofozoítos em encistamento e ativos apresentam características ultraestruturais semelhantes

Por meio da microscopia eletrônica de transmissão, foi possível visualizar a presença de partículas esféricas e ovais, com tamanho variável e compatíveis com vesículas extracelulares obtidas das diferentes populações de VEs (**Figura 16**). O aspecto das vesículas EP, ET e TA foi similar, estando agrupadas ou isoladas de maneira periférica próximas as telas presentes no processo de preparação da MET. Foi possível observar um agregado de vesículas de diferentes tamanhos, porém comum em todos os protocolos. Também foi possível a visualização clara borda da vesícula.

Figura 16 – Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de vesículas extracelulares (VEs) de *Acanthamoeba* derivadas de trofozoítos em encistamento e de trofozoítos ativos

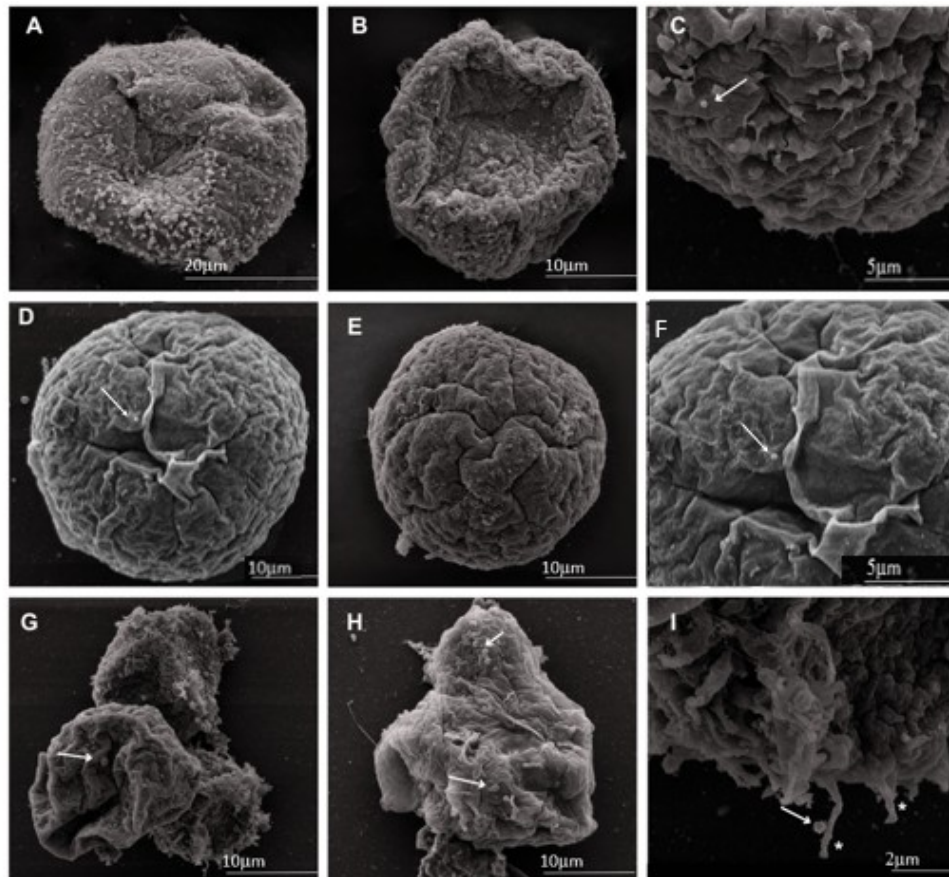


VEs derivadas de trofozoítos em encistamento precoce (por 4h) (**A, D**), em encistamento tardio (por 24h) (**B, E**) e ativos (**C, F**). A borda da vesícula está apontada pela seta branca em vesícula individualizada.

Além da visualização das VEs purificadas, VEs presentes na superfície dos trofozoítos foram identificadas por microscopia eletrônica de varredura (**Figura 17**). Pode-se notar que trofozoítos incubados em meio NEFF para encistamento apresentaram aspecto arredondado e tiveram claramente uma redução da emissão dos seus acantopódios (**Figura 17A-E**) quando comparadas aos mantidos em

condições de abundância nutricional em meio RPMI (**Figura 17F-H**). Estruturas compatíveis com VEs são visualizadas na superfície de todas as formas.

Figura 17 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de trofozoítos de *Acanthamoeba* em encistamento e ativos



Os trofozoítos foram induzidos a encistar em salina de NEFF por 4h (**A-C**) e por 24h (**D-E**) ou foram mantidos em meio RPMI, em metabolismo ativo (**F-H**). As setas indicam estruturas vesiculares na superfície das formas evolutivas. Os asteriscos indicam a formação de acantopódios nos trofozoítos ativos, o que não é observado naqueles induzidos a encistar.

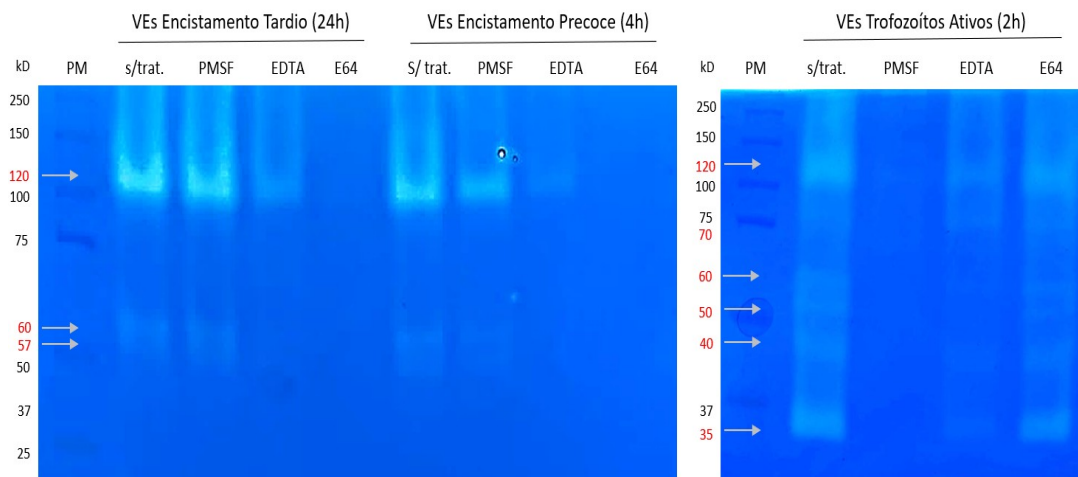
5.3 VEs de formas em encistamento apresentam perfil zimográfico distinto das VEs de trofozoítos ativos

Todas as amostras de VEs apresentaram atividade proteolítica. Comparativamente, os protocolos com VEs do encistamento (precoce e tardio) tiveram um perfil de protease semelhantes entre eles, com bandas de 120kDa, 60 kDa e 57 KDa, indicando que independente do tempo de encistamento (4h ou 24h) não há distinção no perfil de proteases carregadas por VEs. Além disso, VEs derivadas de formas em encistamento carregam predominantemente cisteíno

proteases, além de apresentarem menor atividade de metaloproteases, conforme inibição quase total pelo E64 e parcial pelo EDTA, respectivamente (**Figura 18**).

As VEs de trofozoítos ativos, por sua vez, foram inibidas significativamente por PMSF, indicando predominância de serinoproteases. A inibição parcial por EDTA também indicou a presença de metaloproteases em menor intensidade. Nestas amostras, o perfil de proteases (sem inibidores) foi distinto e com maior quantidade de bandas que das VEs de formas em encistamento.

Figura 18 – Zimografia de vesículas extracelulares (VEs) de *Acanthamoeba* obtidas de trofozoítos em encistamento e ativos



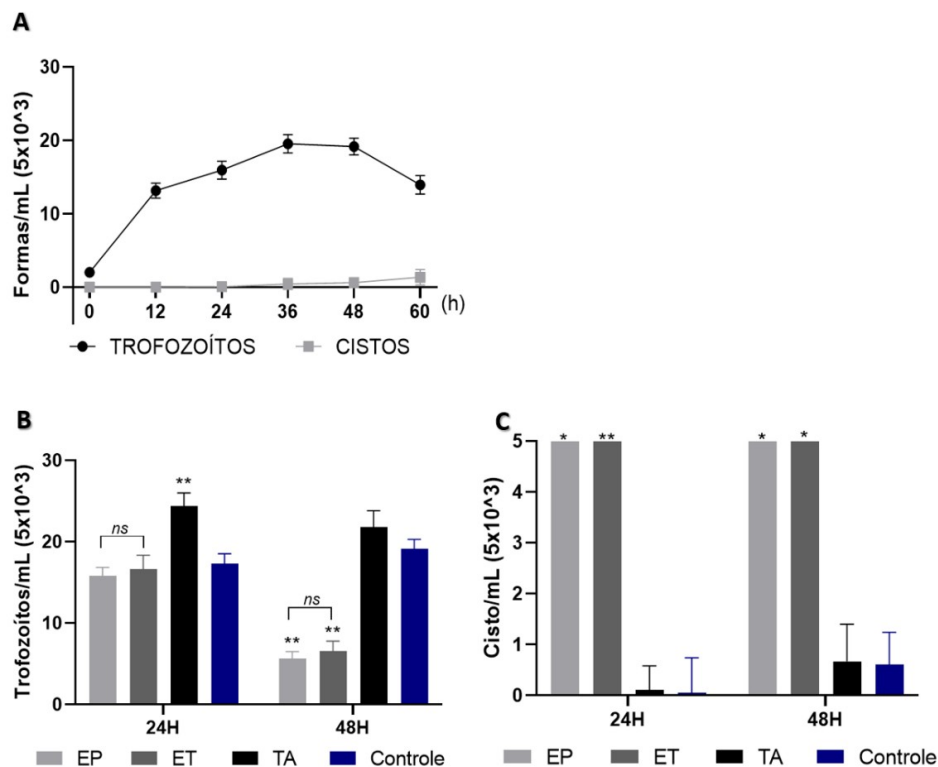
Gel de poliacrilamida copolimerizado com gelatina carregado com 4,4 mg de proteínas de VEs de formas em encistamento (precoce e tardio) e ativos. As VEs de formas em encistamento apresentaram perfis proteolíticos similares, com bandas claras (áreas de digestão) correspondentes a proteases de 120 kDa, 60 kDa e 57 kDa, predominantemente cisteíno proteases (inibidas por E64) e metaloproteases (parcialmente inibidas por EDTA). Já as VEs de trofozoítos ativos exibiram maior diversidade proteolítica, com destaque para serino proteases (fortemente inibidas por PMSF) e, secundariamente, metaloproteases (parcialmente inibidas por EDTA). "s/trat." identifica VEs sem adição de inibidores.

5.4 O desenvolvimento das formas em meio PYG é afetado pela adição de vesículas extracelulares exógenas

Para avaliar o efeito das VEs em *Acanthamoeba*, inicialmente foi feita a contagem periódica das formas presentes na cultura, a fim de montar uma curva de crescimento com inóculo inicial de 1×10^4 trofozoítos/mL. Houve aumento exponencial destas formas até 48h, quando então começaram a cair em número (**Figura 19A**). Assim, definiu-se que a avaliação do efeito da adição de VEs exógenas sobre os trofozoítos seria realizada nos tempos de 24h e 48h. Quando adicionadas VEs de trofozoítos ativos (TA), houve aumento da quantidade de trofozoítos em comparação

ao controle no tempo de 24h ($p < 0,001$) (**Figura 19B**). Por outro lado, a adição de VEs exógenas de formas em encistamento precoce (EP) e tardio (ET) inibiu a multiplicação dos trofozoítos em relação ao controle (no tempo de 48h ($p < 0,001$) (**Figura 19B**). Ao avaliar a possibilidade de uma resposta diferente entre vesículas EP e ET sobre os trofozoítos, não foram encontradas diferenças significativas ($p = 0,438$) (**Figura 19B**). Durante o ensaio, observou-se a presença de pequena quantidade de cistos no meio. Assim, estas formas também foram contabilizadas, indicando que a adição de vesículas EP e ET levam a um aumento das formas císticas nos tempos de 24h e 48 h em relação ao controle ($p < 0,02$) (**Figura 19C**). Também se observou que a capacidade de vesículas ET em estimular a formação de cistos foi maior do que as vesículas EP ($p < 0,001$) nos dois tempos. As vesículas TA, ao contrário, inibiram significativamente a formação de cistos às 48h (**Figura 19C**).

Figura 19 – Avaliação da multiplicação de *Acanthamoeba* em meio PYG e do efeito de adição de vesículas extracelulares (VEs) exógenas

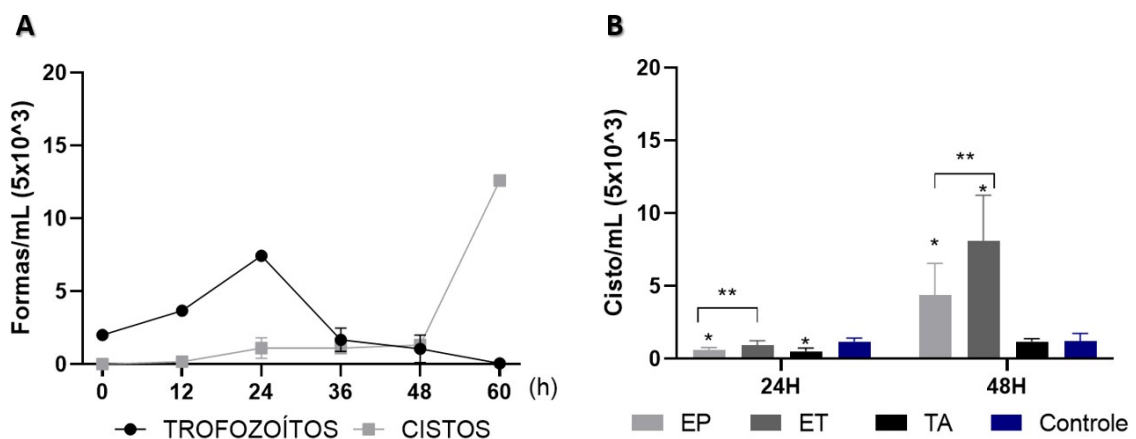


(A) Curva de crescimento de trofozoítos em meio PYG, com inóculo inicial de 1×10^4 trofozoítos/ml, incluindo a formação de cistos. (B) Efeito das vesículas EP, ET e TA comparado ao controle (sem VEs) na quantidade de trofozoítos; (C) Efeito das vesículas EP, ET e TA calculada em relação ao controle (sem VEs), na quantidade de cistos, às 24 e 48h. Cada poço com 500 mL de meio recebeu 4,40 mg de VEs, obtidas de trofozoítos em encistamento precoce por 4h (EP), encistamento tardio por 24h (ET) e ativos após 2h de vesiculação (TA). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *ns* = não significativo.

5.5 Vesículas extracelulares exógenas obtidas de formas em encistamento estimulam a formação de cistos

Para investigar se as VEs influenciam o encistamento de *Acanthamoeba*, utilizamos um meio sem nutrientes, hipertônico e que naturalmente estimula o encistamento de trofozoítos (salina de encistamento de NEFF). Da mesma forma que no tópico anterior, realizamos uma curva de encistamento de trofozoítos com um inóculo inicial de 1×10^4 trofozoítos/mL. Até as 24 horas, houve um aumento de formas trofozoíticas e em seguida uma queda abrupta, até seu desaparecimento às 60h. Os cistos maduros se formaram lentamente, com aumento substancial entre 48 e 60h (**Figura 20A**). No ensaio de adição de VEs, as vesículas EP e TA tiveram efeito inibitório na produção de cistos às 24h ($p < 0,01$), mas as vesículas ET não afetaram a formação dos cistos ($p = 0,274$) (**Figura 20B**). Em contrapartida, em 48h foi possível observar que houve aumento significativo de cistos na presença de vesículas EP e ET, ($p = 0,03$) e ($p = 0,005$), respectivamente (**Figura 20B**). Ao compararmos apenas o efeito das vesículas EP e ET, estas últimas estimularam significativamente mais a formação de cistos do que as primeiras ($p = 0,008$) no tempo de 48h.

Figura 20 – Avaliação do encistamento de *Acanthamoeba* em meio NEFF e do efeito da adição de vesículas extracelulares (VEs) exógenas

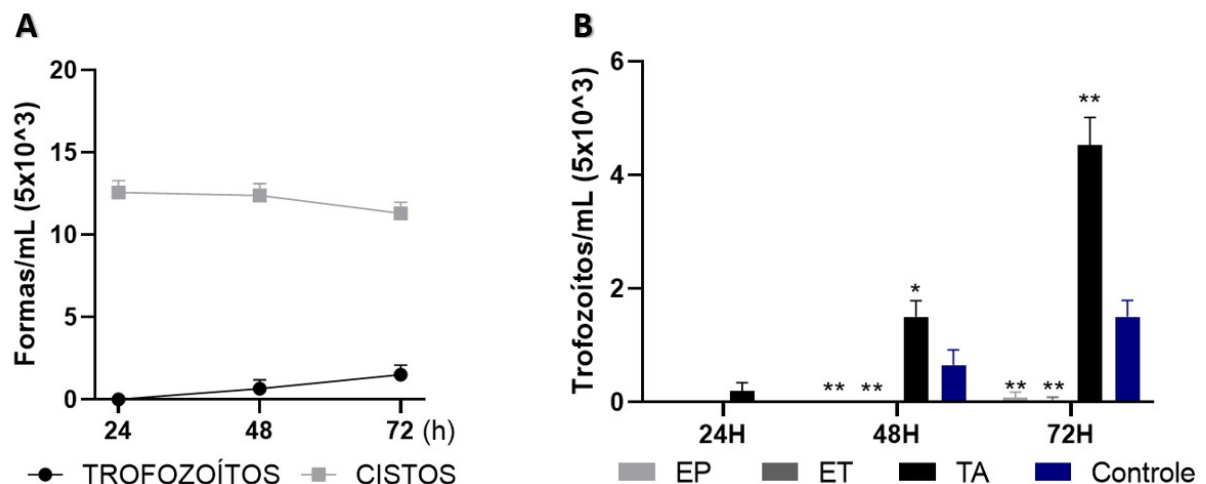


Curva de formação de cistos, a partir da adição de 1×10^4 trofozoítos/mL em salina de encistamento de NEFF. Os trofozoítos também foram contabilizados (**A**). Efeito da adição de vesículas exógenas EP, ET e TA comparado ao controle (sem VEs), para a contagem de cistos, às 24 e 48h (**B**). Cada poço com 500 μ L de meio recebeu 4,40 μ g de VEs de trofozoítos em encistamento precoce por 4h (EP), encistamento tardio por 24h (ET) e ativos após 2h de vesiculação (TA). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.6 Vesículas extracelulares exógenas podem retardar ou estimular o desencistamento de *Acanthamoeba*

Na avaliação do efeito de VEs no desencistamento, em que cistos foram colocados em meio PYG, a curva inicialmente obtida indicou a presença de trofozoítos entre 24h e 48h e o aumento progressivo do número destas formas entre 48h e 72h (**Figura 21A**). Assim, o efeito da adição de VEs exógenas foi realizado nesses três tempos. A adição de vesículas TA aumentou significativamente a quantidade de trofozoítos nos tempos 48h e 72h ($p < 0,0001$). A adição de vesículas EP e ET, por outro lado, impediram o desencistamento a ponto de trofozoítos não serem contabilizados às 24h e 48h e estarem presentes em quantidade significativamente menor ($p < 0,0001$) no tempo de 72h (**Figura 21B**).

Figura 21 – Efeito da adição de vesículas extracelulares (VEs) exógenas no desencistamento de *Acanthamoeba*



Curva de desencistamento a partir do inóculo inicial de 1×10^4 cistos em meio PYG (**A**). Efeito da adição de vesículas exógenas EP, ET e TA comparado ao controle (sem VEs), para a contagem de cistos às 24h, 48h, 72h (**B**). Cada poço com 500 μ L de meio recebeu 4,40 μ g de VEs, obtidas de trofozoítos em encistamento precoce por 4h (EP), encistamento tardio por 24h (ET) e ativos após 2h de vesiculação (TA). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6 DISCUSSÃO

As amebas de vida livre, especialmente as do gênero *Acanthamoeba*, possuem uma capacidade de resistência intrigante. Os trofozoítos detectam rapidamente qualquer adversidade em seu ambiente e formam cistos, tornando-se mais resistentes. A resistência dos cistos está intimamente ligada à persistência das

infecções, pois essa característica dificulta a penetração de medicamentos, a ação de substâncias amebicidas e a atuação do sistema imunológico. O processo de encistamento é desencadeado por sinais externos, como mudança nas condições ambientais, o que resulta em diminuição metabólica e modificações estruturais (ANWAR; KHAN; SIDDIQUI, 2018). A formação da parede cística não é imediata, pois inicialmente há uma fase de indução, seguida de síntese da parede cística (primeiro o ectocisto e depois do endocisto), e por fim uma fase de dormência (Wiesman *et al.*, 1976). Os trofozoítos ativos, em fase de multiplicação e em condições de abundância nutricional, liberam no meio vesículas extracelulares (VEs) (GONÇALVES *et al.*, 2018; RETANA-MOREIRA *et al.* 2015, LIN *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2021). No entanto, não se conhecia, até o momento, se as formas induzidas ao encistamento produziam VEs e qual seu papel em diferentes processos biológicos do protozoário. Neste estudo essa hipótese foi confirmada a partir do encistamento *in vitro* em salina de encistamento de NEFF, que promove o processo pela ausência de nutrientes, presença de cátions Mg^{++} e Ca^{++} e pH 9 (NEFF *et al.*, 1964).

Considerando que um ponto importante durante a obtenção de VEs é garantir que as células estejam viáveis (WELSH *et al.*, 2024; ZHANG *et al.*, 2024), avaliamos a viabilidade na salina de NEFF, obtendo valores acima de 97% nas 4h e 24 h em que as VEs foram recuperadas do meio. A viabilidade dos trofozoítos em encistamento foi comparável à de trofozoítos ativos no meio RPMI, que durante as 2h de vesiculação foi acima de 95%, conforme obtido nesse estudo e no trabalho anterior (COSTA *et al.*, 2021). Estes dados atestam a integridade das células produtoras de VEs durante a indução do encistamento, evitando que alterações relacionadas à morte celular possam interferir nas propriedades das VEs obtidas. Ressalta-se que o rendimento com o protocolo proposto, usando 10^6 trofozoítos/mL para vesiculação e as centrifugações seriadas, atingiu a ordem de 10^{11} partículas/mL tanto para trofozoítos ativos quanto para trofozoítos em encistamento, reproduzindo o rendimento obtido no estudo anterior (COSTA *et al.*, 2021). Além disso, as dimensões das VEs de *Acanthamoeba* das diferentes populações (trofozoítos ativos e em encistamento) apresentaram um perfil homogêneo entre 129,8 nm a 184,0 nm, similar ao de outros trabalhos com trofozoítos de *Acanthamoeba* (GONÇALVES *et al.*, 2018; RETANA-MOREIRA *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2019 e MOREIRA *et al.*, 2024).

E por fim, as imagens da microscopia eletrônica confirmaram a produção de VEs não só pelas formas ativas, mas também por formas induzidas ao encistamento em tempos precoce e tardio após o estímulo.

A partir desta caracterização geral das VEs de diferentes populações, realizamos a sua avaliação funcional, primeiramente pela análise de proteases carregadas. A presença de proteases em VEs derivadas de trofozoítos ativos de *Acanthamoeba* já é conhecida (GONÇALVES *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2015 e LIN *et al.*, 2019. No trabalho de Costa *et al.*, (2021), mostrou-se a predominância de serino proteases nas VEs de trofozoítos, além de essas atuarem na resposta inata, de forma protease dependente, ou sejam ao usar inibidores de proteases, as VEs deixaram de estimular a produção de óxido nítrico e citocinas por macrófagos murinos. No presente estudo, ao avaliar as proteases das diferentes populações de VEs, observamos uma mudança no perfil zimográfico das formas em encistamento comparadas ao de trofozoítos ativos. Ao invés de serino proteases, foram predominantes as cisteíno proteases. Durante o encistamento de *Acanthamoeba*, há ação tanto de serino proteases quanto de cisteíno proteases, conforme estudos de Moon *et al.*, (2012). Estes autores demonstraram o aumento da expressão gênica de serino e cisteíno proteases durante a formação de cistos, além de indicarem a localização destas proteases em estruturas vesiculares no interior das formas, por meio de marcação fluorescente de proteínas recombinantes (MOON *et al.*, 2012). Além disso, um estudo anterior mostrou que o uso de inibidores de serino e cisteíno proteases impede o encistamento (LEITSCH *et al.*, 2010). As proteases dessas duas classes são essenciais na degradação de organelas e proteínas durante as alterações estruturais do encistamento. Conforme dados desse estudo, a mudança de um perfil predominante de serino proteases para cisteíno proteases indica que as VEs liberadas por *Acanthamoeba* podem passar por alterações funcionais de acordo com a fase do ciclo celular. Estudos adicionais são necessários para compreender porque *Acanthamoeba* exterioriza diferentes tipos de proteases nas VEs nas formas ativas e nas formas induzidas ao encistamento.

Continuando a avaliação funcional das VEs, investigamos a hipótese de que estas poderiam influenciar no ciclo celular de *Acanthamoeba*. A ação de VEs na mudança de estágio evolutivo foi previamente demonstrada por Sharma *et al.*, (2021) com outro protista ameboide, *E. histolytica*. Nesse estudo, os autores

produziram VEs a partir de células em processo de encistamento e de formas trofozoíticas, observando uma mudança no perfil proteico. Em seguida, as VEs produzidas foram colocadas em contato com uma linhagem celular geneticamente modificada de *E. invadens*. Foi possível observar que as VEs interagiram com essa linhagem, mesmo sendo provenientes de outra espécie, e estimularam o encistamento. No presente estudo, utilizamos uma abordagem similar, considerando que *Acanthamoeba* encista no ambiente e no tecido. Testando primeiro a ação das VEs em formas em crescimento, ficou claro que VEs obtidas de trofozoítos ativos estimulam de forma positiva o crescimento celular de trofozoítos no meio. Por outro lado, as VEs de formas em encistamento inibem significativamente o desenvolvimento dos trofozoítos e ao mesmo tempo, causaram maior formação de cistos em PYG, mesmo em uma situação de abundância nutricional neste meio.

Interessantemente, um estudo antigo, publicado em 1978, discute alguns fatores indutores de encistamento, como a composição e concentração de sais e a redução de cátions favorecendo a permeabilidade celular, porém levanta a possibilidade de outro fator indutor do encistamento liberado pelas próprias amebas (LASMAN, 1978). O autor obteve sobrenadantes da cultura em diferentes tempos e observou o aumento do efeito indutor de encistamento nos tempos mais tardios. Assim, é possível que o as VEs, antes não conhecidas, possam representar um destes fatores que fornecem a sinalização a outras amebas.

No desencistamento, a sinalização pelas VEs também ficou evidente, pois a adição de vesículas de formas ativas aumentou, enquanto a adição de vesículas de formas em encistamento precoce e tardio impediu significativamente o processo. Esses resultados reforçaram que de fato as VEs influenciam no ciclo celular e não somente das formas trofozoíticas de *Acanthamoeba*, mas também nas formas císticas. Ou seja, de alguma forma as VEs conseguem se comunicar com os cistos e gerar uma sinalização que estimula ou desestimula o desencistamento. Mattar e Byers (1971), em um estudo com *Acanthamoeba*, detalharam que quando os cistos são transferidos para um meio adequado, logo nos primeiros sete minutos o citoplasma intensifica suas movimentações internas em direção ao endocisto. Em apenas 30 minutos, os grânulos lipídicos presentes no endocisto desaparecem e surge um movimento contrátil. Entre 12 e 36 horas, a ameba separa-se completamente do endocisto, forma uma protuberância no ectocisto, evadindo-o em

seguida para se fixar em alguma superfície. A saída do trofozoítos se dá por um dos ostíolos, regiões da parede cística em que o ectocisto e endocisto se unem formando uma camada contínua (CHAVES-MUNGUÍÁ *et al.*, 2005). Sabe-se que os cistos, por meio dos ostíolos, conseguem captar naturalmente as variações do ambiente, promovendo o desencistamento (KHAN, 2006). Assim, uma possível hipótese é que as VEs adicionadas poderiam enviar os sinais de diferenciação por esta região, sinalizando ao trofozoíto interno um possível estímulo para se manter protegido ou se exteriorizar.

A captação de VEs por células de cultivo, simulando o que pode ocorrer durante a infecção e confirmando o papel na comunicação intercelular, tem sido demonstrada em vários protozoários. O parasito intestinal *Giardia* libera VEs que interagem com células Caco2 (células de adenocarcinoma de epitélio intestinal humano) (GAVINHO *et al.*, 2020). Vários outros protistas como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* e *Trichomonas* liberam VEs que afetam a relação parasito-hospedeiro (NOGUEIRA *et al.*, 2015, 2020; SZEMPRUCH *et al.*, 2016; NIEVAS *et al.*, 2018), assim como já observado em *Acanthamoeba* (LIN *et al.*, 2019, COSTA *et al.*, 2021). No entanto, o presente estudo é o primeiro a demonstrar o papel funcional das VEs de *Acanthamoeba* no ciclo do próprio protozoário, pois até o momento, não havia relatos sobre a capacidade de interação ou modulação da formação dos cistos com VEs, o que torna esses dados inéditos e abre possibilidades para novas abordagens científicas.

A partir dos dados obtidos, outras perguntas que poderiam ser investigadas é se o efeito das VEs no ciclo celular seria dose-dependentes, cepa-dependentes ou protease-dependentes. Considerando ainda o papel das VEs na resposta inata (COSTA *et al.*, 2021), avaliar se as diferentes populações induzem perfis diferentes de estimulação de citocinas pode auxiliar a compreender melhor a relação patógeno-hospedeiro associada às distintas fases do protozoário.

Diante da complexidade, ausência de tratamento específico e da resistência das infecções causadas por *Acanthamoeba*, explorar novas abordagens terapêuticas é uma necessidade urgente para lidar com as acantamebíases. As VEs desempenham papéis importantes na comunicação e sinalização celular e sua heterogeneidade molecular e estrutural pode ser explorada na busca de fatores para modificar o ciclo de encistamento e desencistamento. Estes fatores poderiam ser a

base de novas substâncias que possam atuar junto com os medicamentos anti-*Acanthamoeba*, impedindo-a de encistar ou estimulando seu desencistamento, promovendo assim sua permanência ou transformação na forma mais suscetível aos amebicidas.

7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos comprovaram que formas de *Acanthamoeba* induzidas a encistar liberam no meio VEs com características biofísicas similares às de trofozoítos ativos, porém com características funcionais diferentes. O perfil zimográfico das VEs de formas em encistamento difere das VEs de trofozoítos ativos e estas diferentes populações de VEs afetam o crescimento ou o encistamento de *Acanthamoeba*. Este estudo indicou, pela primeira vez, o papel das VEs na comunicação célula a célula de *Acanthamoeba*, sugerindo que, no ambiente de infecção, os trofozoítos possam enviar sinais a outras formas como estratégia de garantir sua sobrevivência.

8 REFERÊNCIAS

1. AIELLO, F. *et al.* Perspectives on the Incidence of *Acanthamoeba* Keratitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. ***Ophthalmology***, 132(2), 206–218. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2024.08.003>.
2. ALFIERI, S.C. *et al.* Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. ***The Journal of parasitology***, 86(2), 220–227. 2000. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0220:PAITEA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0220:PAITEA]2.0.CO;2).
3. ANWAR, A; KHAN, A; SIDDIQUI, R. Combating *Acanthamoeba* spp. cysts: what are the options?. ***Parasites & Vectors***, 11(1), 26. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2572-z>.
4. AQEEL, Y; *et al.* The effect of different environmental conditions on the encystation of *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. ***Experimental Parasitology***, 135(1), 30–35. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.017>.
5. BHARATHI, J. *et al.* A study of the spectrum of *Acanthamoeba* keratitis: a three-year study at a tertiary eye care referral center in south india. ***Indian Journal of Ophthalmology***, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 37, 2007. <https://dx.doi.org/10.4103/0301-4738.29493>.
6. BRINDLEY, N *et al.* *Acanthamoeba castellanii*: high antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. ***Experimental Parasitology***, [S.L.], v. 121, n. 3, p. 254-256, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2008.11.009>.
7. CAVALCANTI, H. N.; SILVA FILHO, T. J.; QUEIROZ, L. M. G. Extracellular vesicles: what we know so far. ***Clinical and Laboratorial Research in Dentistry***. 2021. <https://doi.org/10.11606/issn.2357-8041.clrd.2021.180055>.

8. CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Naegleria fowleri* infections. 21 de julho de 2025. Disponível em <https://www.cdc.gov/naegleria/about/index.html> Acesso em 10 de agosto de 2025.
9. CHÁVEZ-MUNGUÍA, B *et al.* Ultrastructural study of encystation and excystation in *Acanthamoeba castellanii*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, 52(2), 153–158. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.04-3273.x>.
10. COLOMBO, M; RAPOSO, G; THÉRY, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 30, 255–289. 2014. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
11. COLTEL N, *et al.* Cell vesiculation and immunopathology: implications in cerebral malaria. **Microbes and Infection**, 8(8), 2305–2316. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.04.006>.
12. CORSARO, D. *et al.* *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). **Parasitology Research**, 114(7), 2481–2490. 2015. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4445-8>.
13. CORSARO, D; VENDITTI, D. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). **Parasitology Research**, 107(1), 233–238. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1870-6>.
14. CORSARO D. Update on *Acanthamoeba* phylogeny. **Parasitology Research**, 119(10), 3327–3338. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06843-9>.
15. COSTA, A. O. *et al.* D Distinct immunomodulatory properties of extracellular vesicles released by different strains of *Acanthamoeba*. **Cell Biology International**, 45(5), 1060–1071. 2021. <https://doi.org/10.1002/cbin.11551>.

16. COUCH, Y. *et al.* A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, 10(14), e12144. 2021. <https://doi.org/10.1002/jev2.12144>.
17. DESAI, N. *et al.* *Acanthamoeba* keratitis. **Diagnostic Cytopathology**, 51(1), 98–100. <https://doi.org/10.1002/dc.25078>.
18. ELSHEIKHA, H. M.; SIDDIQUI, R; KHAN, Drug Discovery against *Acanthamoeba* Infections: Present Knowledge and Unmet Needs. **Pathogens** (Basel, Switzerland), 9(5), 405. 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050405>.
19. FERNANDEZ-BECERRA, C. *et al.* Guidelines for the purification and characterization of extracellular vesicles of parasites. **Journal of Extracellular Biology**, 2(10), e117. Out 2023. <https://doi.org/10.1002/jex2.117>.
20. FUERST, P. A., BOOTON, G. C., & CRARY, M. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, 62(1), 69–84, 2015. <https://doi.org/10.1111/jeu.12186>
21. GAVINHO, B. *et al.* Peptidylarginine Deiminase Inhibition Abolishes the Production of Large Extracellular Vesicles From *Giardia intestinalis*, Affecting Host-Pathogen Interactions by Hindering Adhesion to Host Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 10, 417. 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00417>
22. GONÇALVES, D. de S. *et al.* Extracellular vesicles and vesicle-free secretome of the protozoa *Acanthamoeba castellanii* under homeostasis and nutritional stress and their damaging potential to host cells. **Virulence**, 9(1), 818–836. 4. 2018. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1451184>.
23. GONÇALVES, M. F. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Experimental Parasitology**, 72(1), 43–53. 1991. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(91\)90119-h](https://doi.org/10.1016/0014-4894(91)90119-h).

24. GUARNER, J. *et al.* Histopathologic spectrum and immunohistochemical diagnosis of amebic meningoencephalitis. ***Modern Pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc***, 20(12), 1230–1237. 2007. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800973>.
25. HASTON, J. C. *et al.* The Epidemiology and Clinical Features of Non-Keratitis *Acanthamoeba* Infections in the United States, 1956-2020. 2023. ***Open forum infectious diseases***, 10(1), ofac682. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac682>
26. HASTON, J. C. *et al.* *Acanthamoeba* Infection and Nasal Rinsing, United States, 1994-2022. ***Emerging Infectious Diseases***, 30(4), 783–785. 2024. <https://doi.org/10.3201/eid3004.231076>.
27. KALRA, S. K. *et al.* *Acanthamoeba* and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis. ***Experimental Parasitology***, 208, 107788. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107788>.
28. KARUSKY, C. de M. *et al.* Atividade amebicida e citotóxica do extrato aquoso de própolis verde contra trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba castellanii*. ***Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology***, 44(3), 283–294. 2015. <https://doi.org/10.5216/rpt.v44i3.38020>.
29. KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. ***FEMS Microbiology Reviews***, 30(4), 564–595. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x>.
30. KOFMAN, A. *et al.* Infections Caused by Free-Living Amoebae. ***Journal of Clinical Microbiology***, 60(1), e0022821. 2022. <https://doi.org/10.1128/JCM.00228-21>.
31. KOT, K.; LANOCHA-ARENDARCZYK, N. A.; KOSIK-BOGACKA, D. I. Amoebas from the genus *Acanthamoeba* and their pathogenic properties. ***Annals of Parasitology***, 64(4), 299–308. 2018. <https://doi.org/10.17420/ap6404.164>.

32. LASMAN, M. Encystment-Inducing Factor from Cultures of *Acanthamoeba palestinensis*: (*Acanthamoeba palestinensis*/growth/cyst formation/encystment-inducing factor). **Development, Growth & Differentiation**, 29(5), 547–552. 1987. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1987.00547.x>
33. LEITSCH, D. *et al.* Proteomic aspects of *Parachlamydia acanthamoebae* infection in *Acanthamoeba* spp. **The ISME Journal**, 4(11), 1366–1374. 2010. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.68>.
34. LIN, W. C. *et al.* Quantitative proteomic analysis and functional characterization of *Acanthamoeba castellanii* exosome-like vesicles. **Parasites & Vectors**, 12(1), 467. out. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3725-z>.
35. LORENZO-MORALES, J. *et al.* RNA interference (RNAi) for the silencing of extracellular serine proteases genes in *Acanthamoeba*: molecular analysis and effect on pathogenicity. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 144(1), 10–15. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.07.001>.
36. LUONG, Lien T; MATHOT, K. J. Facultative parasites as evolutionary stepping-stones towards parasitic lifestyles. **Biology Letters**, 15(4), 20190058. 2019. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0058>.
37. MACIVER, S. K. *et al.* A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. **European Journal of Protistology**, 49(2), 217–221. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2012.11.004>.
38. MANTEL, P, *et al.* Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. **Cell Host & Microbe**, 13(5), 521–534. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.009>.
39. MATTAR, Fathy E.; BYERS, Thomas J. Morphological changes and the requirements for macromolecule synthesis during excystment of

- Acanthamoeba castellanii*. **The Journal of Cell Biology**, 49(2), 507–519. 1971. <https://doi.org/10.1083/jcb.49.2.507>.
40. MARCIANO-CABRAL, F. *et al.* Interaction of an *Acanthamoeba* human isolate harboring bacteria with murine peritoneal macrophages. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, 50 Suppl, 516–519. 2003. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00615.x>.
41. MARCILLA, A, *et al.* Extracellular vesicles in parasitic diseases. **Journal of Extracellular Vesicles**, 3, 25040. 2014. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.25040>.
42. MIKO, S. *et. al.* (Mis)perception and Use of Unsterile Water in Home Medical Devices, PN View 360+ Survey, United States, August 2021. **Emerging Infectious Diseases**, 29(2), 397–401. 2023. <https://doi.org/10.3201/eid2902.221205>.
43. MOON, Eun-Kyung. *et al.* Cysteine protease involving in autophagosomal degradation of mitochondria during encystation of *Acanthamoeba*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 185(2), 121–126. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.07.008>.
44. MORRISON, A. O. *et al.* Disseminated *Acanthamoeba* Infection Presenting With Cutaneous Lesions in an Immunocompromised Patient: A Case Report, Review of Histomorphologic Findings, and Potential Diagnostic Pitfalls. **American Journal of Clinical Pathology**, 145(2), 266–270. 2016. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqv08>.
45. NIEDERKORN, J. Y. The biology of *Acanthamoeba* keratitis. **Experimental Eye Research**, 202, 108365. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108365>.
46. NIEVAS, Y. R. *et al.* Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: characterization and their association with cell interaction. **Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS**, 75(12), 2211–2226. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2726-3>.

47. NOGUEIRA, P. M. *et al.* Immunomodulatory Properties of *Leishmania* Extracellular Vesicles During Host-Parasite Interaction: Differential Activation of TLRs and NF- κ B Translocation by Dermotropic and Viscerotropic Species. ***Frontiers in Cellular and Infection Microbiology***, 10, 380. 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00380>.
48. NOGUEIRA, P. M. *et al.* Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. ***Journal of Extracellular Vesicles***, 4, 28734. 2015. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28734>.
49. OROZCO, V. R. *et al.* Isolation and morphological characterization of *Acanthamoeba* spp in water tanks of residential buildings. ***Research, Society and Development***, 10(2), e36110212639. 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12639>.
50. PAGE, F. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. [S.l: s.n.], 1988.
51. PARK, M. *et al.* Cutaneous *Acanthamoeba* infection presenting with granulomatous vasculitis. ***National Society for Cutaneous Medicine***, v. 7, n. 2, p. 700–704. 2023. <https://skin.dermsquared.com/skin/article/view/1648/1597>
52. POSSAMAI, C. O. *et al.* *Acanthamoeba* of three morphological groups and distinct genotypes exhibit variable and weakly inter-related physiological properties. ***Parasitology Research***, 117(5), 1389–1400. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5824-8>.
53. PUTAPORNTIP, C. *et al.* Analysis of *Acanthamoeba* genotypes from public freshwater sources in Thailand reveals a new genotype, T23 *Acanthamoeba bangkokensis* sp. nov. ***Scientific Reports***, 11(1), 17290. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96690-0>.
54. PUSSARD, M. & PONS, R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). ***Protistologica***, 13, 557-598. 1977.
55. QVARNSTROM, Y *et al.* Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria*

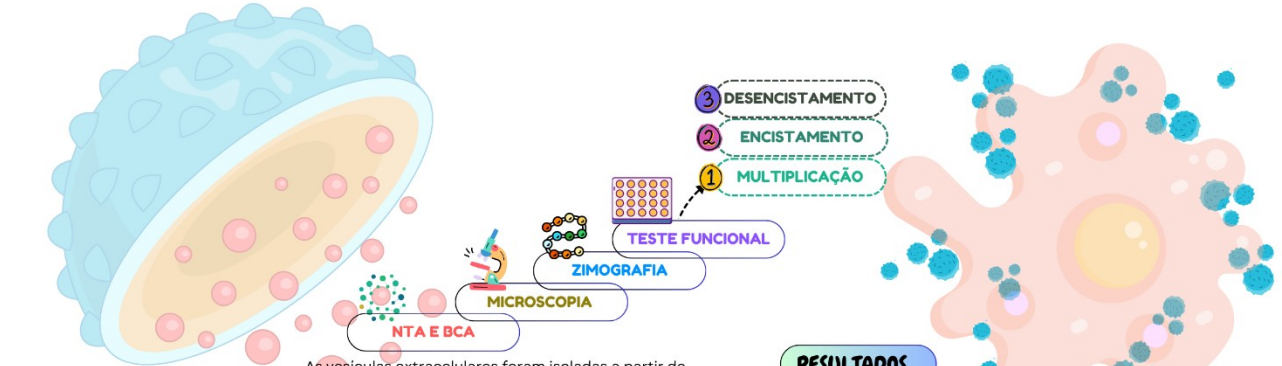
- fowleri*. **Journal of Clinical Microbiology**, 44(10), 3589–3595. 2006. <https://doi.org/10.1128/JCM.00875-06>.
56. RAPOSO, G; STOOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal of Cell Biology**, 200(4), 373–383. 2013. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
57. RETANA-MOREIRA, L. *et al.* Isolation and Molecular Characterization of *Acanthamoeba* Strains from Dental Units in Costa Rica. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, 62(6), 733–736. 2015. <https://doi.org/10.1111/jeu.12229>.
58. REGEV-RUDZKI, N *et al.* Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. **Cell**, 153(5), 1120–1133. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.029>.
59. SCHAUMBERG, D. A.; SNOW, K. K; DANA, M. R. The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: where do we stand?. **Cornea**, 17(1), 3–10. 1998. <https://doi.org/10.1097/00003226-199801000-00001>.
60. SCHUSTER, F. L; VISVESVARA, G. S. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. **Veterinary Parasitology**, 126(1-2), 91–120. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.019>.
61. SCHUSTER, F. L; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for Parasitology**, 34(9), 1001–1027. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.004>.
62. SEAL, D. V. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. **Eye (London, England)**, 17(8), 893–905. 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6700563>.
63. SHARMA, M. *et al.* Characterization of Extracellular Vesicles from *Entamoeba histolytica* Identifies Roles in Intercellular Communication That Regulates Parasite Growth and Development. **Infection and Immunity**, 88(10), e00349-20. 2020. <https://doi.org/10.1128/IAI.00349-20>.
64. SIDDIQUI, R; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasites & Vectors**, 5, 6. 2012. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-6>.

65. SIDDIQUI, R. *et al.* Area Area 51: How do *Acanthamoeba* invade the central nervous system?. **Trends in Parasitology**, 27(5), 185–189. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.01.005>.
66. SINGH, B.N; DAS, S.R. Studies on pathogenic and non-pathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order amoebida. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, 259(832), 435–476. 1970. <https://doi.org/10.1098/rstb.1970.0063>.
67. SOARES, R. P. *et al.* *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. **International Journal for Parasitology**, 35(3), 245–253. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.12.008>.
68. SOARES, R. P. *et al.* Highlights of the São Paulo ISEV workshop on extracellular vesicles in cross-kingdom communication. **Journal of Extracellular Vesicles**, 6(1), 1407213. 2017. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1407213>.
69. SÜTÇÜ, M *et al.* Granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in an immunocompetent child. **The Turkish Journal of Pediatrics**, 60(3), 340–343. 2018. <https://doi.org/10.24953/turkjped.2018.03.019>.
70. SZEMPRUCH, A. J., *et al.* Extracellular Vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia. **Cell**, 164(1-2), 246–257. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.051>.
71. THAMTAM, V. *et al.* Fatal granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a newly diagnosed patient with systemic lupus erythematosus. **Neurology India**, 64(1), 101–104. 2016. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.173662>.
72. THÉRY, C. *et al.* Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Current protocols in cell biology**, Chapter 3. 2006. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>.
73. THÉRY, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of**

- Extracellular Vesicles**, 7(1), 1535750. 2018.
<https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.
74. TORRECILHAS, A. C. *et al.* Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. **Microbes and Infection**, 14(15), 1465–1474. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.07.008>.
75. TORRECILHAS, A. C., *et al.* Extracellular Vesicles in Trypanosomatids: Host Cell Communication. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 10, 602502. 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.602502>.
76. WELSH *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. **Journal of Extracellular Vesicles**, 13(2), e12404. 2024. <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>.
77. YERA, H. *et al.* PCR and culture for diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. **The British Journal of Ophthalmology**, 105(9), 1302–1306. 2021. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2020-316730>.
78. ZAMANIAN, M. *et al.* Release of Small RNA-containing Exosome-like Vesicles from the Human Filarial Parasite *Brugia malayi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 9(9), e0004069. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004069>.
79. ZHANG, Y *et al.* The global epidemiology and clinical diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. **Journal of Infection and Public Health**, 16(6), 841–852. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.03.020>.
80. ZHANG Y, LAN M, CHEN Y. Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles (MISEV): Ten-Year Evolution (2014-2023). **Pharmaceutics**, 16(11), 1394. 2024. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16111394>.
81. ZITVOGEL L, *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. **Nature Medicine**, 4(5), 594–600. 1998. <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>.

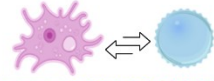
9 ANEXO

UFMG
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 FACULDADE DE FARMÁCIA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
 BRUNA MADEIRA DE SOUSA FIUZA



INTRODUÇÃO

As acantamebíases são doenças causadas por Acanthamoeba, em destaque a Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) e Ceratite Amebiana (CA). Essas infecções são de difícil diagnóstico e tratamento devido à resistência dos cistos. Acanthamoeba possui um ciclo de vida com trofozoítos (forma ativa) e cistos (forma de resistência) e está amplamente distribuída no meio ambiente.



EAG (ENCEFALITE AMEBIANA GRANULOMATOSA)
 A EAG é uma doença rara, com mortalidade superior a 97%, que afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos. Caracteriza-se por um quadro de inflamação crônica no sistema nervoso central devido a presença de Acanthamoeba, com sintomas inespecíficos, diagnóstico frequentemente tardio, e o prognóstico, desfavorável.

CERATITE AMEBIANA
 A ceratite amebiana é uma infecção ocular grave associada ao uso de lentes de contato, especialmente em condições inadequadas de higienização. As complicações que podem comprometer a visão levando a cegueira.

Vesículas extracelulares (VEs)
 Recentemente, as vesículas extracelulares (VEs) liberadas por estas amebas têm despertado interesse devido ao seu papel na comunicação intercelular e em processos relacionados à patogenicidade. A análise dessas vesículas oferece uma nova perspectiva sobre os mecanismos de interação patógeno-hospedeiro.

"ACANTHAMOEBA E VESÍCULAS EXTRACELULARES"

METODOLOGIA

As vesículas extracelulares foram isoladas a partir de culturas de Acanthamoeba em diferentes estágios evolutivos: trofozoítos ativos (TA) e em processo de encistamento precoce (EP) e tardio (ET).

OBJETIVOS

Investigar o papel das vesículas extracelulares (VEs) de diferentes formas evolutivas de Acanthamoeba nos processos de encistamento, desencistamento e multiplicação celular, avaliando suas características biofísicas, ultraestruturais e atividades funcionais.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou, pela primeira vez, que VEs desempenham um papel funcional no ciclo celular de Acanthamoeba, influenciando os processos de encistamento e desencistamento.

RESULTADOS

Trofozoítos ativos e em encistamento produziram VEs em rendimentos similares
 VEs apresentaram tamanhos homogêneos (129,8–184,0 nm)
 Microscopia eletrônica confirmou a presença de VEs
 VEs de trofozoítos ativos apresentaram predominância de serino proteases, e de encistamento, cisteino proteases, indicando alteração protéica.

TESTE FUNCIONAL

- Multiplicação:**
- VEs de trofozoítos ativos estimularam a multiplicação celular.
 - VEs de formas em encistamento precoce e tardio inibiram a multiplicação.
- Encistamento:**
- VEs de formas em encistamento precoce e tardio aceleraram a formação de cistos, mesmo em meio nutricional abundante.
- Desencistamento:**
- VEs de trofozoítos ativos estimularam o desencistamento.
 - VEs de formas em encistamento precoce e tardio inibiram o desencistamento.

