

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADO: Ana Carolina Carvalho Silva

ORIENTADOR: Ana Paula Salles Moura Fernandes

BELO HORIZONTE

Julho – 2017

Ana Carolina Carvalho Silva

Análise proteômica comparativa de trofozoítos de *Acanthamoeba* antes e após
reisolamento de córnea em modelo animal de ceratite amebiana.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Genética, Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Genética.

Orientadora: Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes

Co-Orientadora: Dra. Adriana Oliveira Costa

Co-Orientador: Dr. Juliano Simões de Toledo

Belo Horizonte

2017

043

Silva, Ana Carolina Carvalho.

Análise proteômica comparativa de trofozoítos de *Acanthamoeba* antes e após reisolamento de córnea em modelo animal de ceratite amebiana [manuscrito] / Ana Carolina Carvalho Silva. – 2017.

99 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes. Co-Orientadora: Dra. Adriana Oliveira Costa; Co-Orientador: Dr. Juliano Simões de Toledo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Genética. 2. Proteômica - Teses. 3. Ceratite por *Acanthamoeba*. I. Fernandes, Ana Paula Salles Moura. II. Costa, Adriana Oliveira. III. Toledo, Juliano Simões de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 575

Ficha elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO
Ana Carolina Carvalho Silva

777/2017
entrada
2º/2015
CPF:
104.526.946-80

Às quatorze horas do dia 24 de julho de 2017, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "Análise proteômica comparativa de trofozoítos de *Acanthamoeba* antes e após reisolamento de córnea em modelo animal de ceratite amebiana", requisito para obtenção do grau de Mestre em Genética. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Ana Paula Salles Moura Fernandes, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Ana Paula Salles Moura Fernandes	UFMG	623.387.576-53	Aprovada
Adriana Costa Oliveira	UFMG	005.042.856-02	Aprovada
Juliano Simões Toledo	UFMG	149.647.468-00	Aprovada
Fernanda Ludolf	CULTEC	040903026-80	Aprovada
Cynthia Furst Leroy Gomes Bueloni	UFES	957.250.940-00	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: Aprovada
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 24 de julho de 2017.

Ana Paula Salles Moura Fernandes - Orientadora Ana Paula Salles Moura Fernandes
Adriana Costa Oliveira - Coorientadora Adriana Costa Oliveira
Juliano Simões Toledo - Coorientador Juliano Simões Toledo
Fernanda Ludolf Fernanda Ludolf
Cynthia Furst Leroy Gomes Bueloni Cynthia Furst



**"Análise proteômica comparativa de trofozoítos de Acanthamoeba
antes e após reisolamento de córnea em modelo animal de ceratite
amebiana."**

Ana Carolina Carvalho Silva

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Ana Paula Salles Moura Fernandes - Orientadora
UFMG


Adriana Costa Oliveira - Coorientadora
UFMG


Juliano Simões Toledo - Coorientador
UFMG


Fernanda Ludolf
COLTEC


Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni
IIFES

Belo Horizonte, 24 de julho de 2017.

“Uma pessoa que nunca cometeu um erro nunca tentou nada de novo”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir viver experiências maravilhosas em minha vida, pela força e coragem para buscar a realização dos meus sonhos.

À professora Dr^a. Ana Paula Fernandes pela orientação, paciência, incentivo e confiança durante esses anos. O carinho e o cuidado que conduz a sua equipe é um exemplo a ser seguido. Muito obrigada por sempre ter estimulado minhas ideias e o meu crescimento.

À professora Dr^a. Adriana Oliveira Costa pela amizade e companheirismo no desenvolvimento do meu trabalho. Obrigada pelas discussões e ensinamentos a cerca da biologia de *Acanthamoeba* e por estar sempre presente quando precisei.

Ao meu co-orientador Dr. Juliano Simões de Toledo pelos vastos ensinamentos sobre a técnica de proteômica desempenhada durante o mestrado.

Ao programa de pós-graduação em genética pela oportunidade de desenvolver o meu projeto de pesquisa.

À CAPES pela concessão da minha bolsa de mestrado, ao CNPq e FAPEMIG pelo fomento do meu projeto.

Ao Dr. Daniel Pimenta do instituto Butantan pelo auxílio nos experimentos de espectrometria de massas.

À toda a equipe do laboratório de biologia molecular da faculdade de Farmácia.

À minha amiga Jéssica Gardone pela constante presença e amizade que me deram direção em diversos momentos de extrema dificuldade. Você é uma pessoa incrível e excelente profissional, aprendi muito com você.

Aos meus queridos amigos Filipe Fidelis, Cecília Cirelli e Isabela Aurora que me proporcionaram momentos de alegria e descontração. Obrigada pela amizade e parceria constante, minhas najas amadas.

Aos meus pais Fátima, Adilson e meu irmão Pedro pelo amor, zelo e constante estímulo para seguir os meus planos e ser feliz. Amo vocês.

As minhas amigas irmãs Jheyneffer Medeiros, Débora Mattos, Natália Mattos, Jeniffer Collucci e Isadora Lamounier por todo apoio e compreensão em todas as fases da minha vida, é imensurável a importância do amor de vocês.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	O gênero <i>Acanthamoeba</i>	12
1.1.1	<i>Histórico</i>	12
1.1.2	<i>Biologia e Morfologia</i>	13
1.1.3	<i>Classificação Morfológica e Molecular</i>	15
1.2	Infecções por <i>Acanthamoeba</i>	17
1.2.1	<i>Encefalite Amebiana Granulomatosa</i>	17
1.2.2	<i>Ceratite Amebiana</i>	18
1.2.2.1	<i>Fisiopatogenia da Ceratite Amebiana</i>	21
1.3	Proteômica	23
1.3.1	<i>Eletroforese Bidimensional (2DE)</i>	24
1.3.2	<i>Espectometria de Massas (MS)</i>	27
1.3.3	<i>Estudos do Proteoma de Acanthamoeba</i>	28
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo Geral	31
3.2	Objetivos Específicos	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	Cultivo de <i>Acanthamoeba</i> spp.	32
4.2	Infecção Experimental e Reisolamento	32
4.3	Extração Proteica dos Trofozoítos	33
4.4	Eletroforese Bidimensional (2DE) em Gel de Poliacrilamida	34
4.5	Análise das imagens dos Géis Bidimensionais	35
4.6	Excisão e Digestão Triptica dos <i>Spots</i>	35
4.7	Espectometria de Massas	36
4.8	Construção dos Gráficos	36
5	RESULTADOS	37
5.1	Infecção Experimental e Reisolamento	37
5.2	Padronização do Método de Extração Proteica dos Trofozoítos	38
5.2.1	<i>Comparação dos Extratos Proteicos por SDS-PAGE</i>	38
5.2.2	<i>Eletroforese Bidimensional (2DE)</i>	38
5.3	Proteômica Comparativa entre Trofozoítos de cultura Axênica de longo prazo e Recém Recuperadas de Lesão de córnea	40
5.3.1	<i>Gel Unidimensional SDS-PAGE</i>	40
5.3.2	<i>Análise dos Imagens dos Géis Bidimensionais</i>	41
5.3.3	<i>Análise Comparativa</i>	46
6	Discussão	57
7	Conclusão	65
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO 1	73
	ANEXO 2	74
	ANEXO 3	76
	ANEXO 4	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Quantidade de artigos relacionados às amebas anfitriais publicados em 5 décadas	11
Figura 2: Trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i>	14
Figura 3: Cistos de <i>Acanthamoeba</i> segundo classificação morfológica de Pussard e Pons (1977).....	16
Figura 4: Corte anatômico e histológico de regiões cerebrais de pacientes com EAG.....	18
Figura 5: Relação entre o número de pacientes investigados e casos confirmados de Ceratite Amebiana entre os anos de 1987 – 2006, em São Paulo, Brasil.....	19
Figura 6: Aspecto do olho de pacientes acometidos por ceratite por <i>Acanthamoeba</i>	20
Figura 7: O processo de invasão da córnea por <i>Acanthamoeba</i>	22
Figura 8: Córnea dos animais utilizados para infecção.....	37
Figura 9: Gel unidimensional SDS-PAGE dos extratos proteicos dos trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> da cepa ALX de longo prazo.....	38
Figura 10: Géis bidimensional em gradiente de pH 4-7 das proteínas totais da cultura de longo prazo ALX (ALXltc).....	39
Figura 11: Gel unidimensional SDS-PAGE dos extratos proteicos dos trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> da cepa ALXltc e dos recuperados ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3.....	41
Figura 12: Géis representativos bidimensionais em gradiente de pH 4-7 de 13 cm das proteínas totais das triplicatas técnicas da (A) cultura de longo prazo ALXltc, (B) ALXrec1, (C) ALXrec2, (D) ALXrec3.....	42
Figura 13: Pareamento (<i>match</i>) dos <i>spots</i> das triplicatas técnicas de cada amostra.....	43
Figura 14: <i>Scatter plots</i> dos géis bidimensionais das triplicatas técnicas de cada amostra.....	44
Figura 15: Pareamento (<i>match</i>) dos <i>spots</i> dos géis representativos da cultura de longo prazo ALXltc a esquerda e das culturas recuperadas (A) ALXrec1, (B) ALXrec2 e (C) ALXrec3.....	47
Figura 16: <i>Heatmap</i> da comparação do padrão de expressão das proteínas identificadas em ALXltc e nas culturas recuperadas ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3.....	54
Figura 17: Gráfico de função molecular e processos biológicos das proteínas identificadas como diferencialmente e exclusivamente expressas em ALXltc, ALXrec1, ALXrec2 e ALXrec3.....	55

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Porcentagem dos <i>spots</i> correspondentes na triplicata técnica da cultura de longo prazo ALXltc e das culturas recuperadas ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3.....	44
Tabela 2: <i>Spots</i> indicados nos géis bidimensionais como diferencialmente expressos entre ALXltc e ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3.....	49
Tabela 3: <i>Spots</i> indicados nos géis bidimensionais como diferencialmente expressos entre ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3.....	51
Tabela 4: <i>Spots</i> indicados nos géis bidimensionais como exclusivamente expressos.....	54
Tabela 5: Proteínas sem anotação para função molecular e processos biológicos...	56

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2DE** – Eletroforese bidimensional
- ACN**- Áceto Nitrila
- AIDS** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- ALXItc** – Cultura de longo prazo
- ALXrec1**- Cultura recuperada de lesão de córnea em animal
- ALXrec2**- Cultura recuperada de lesão de córnea em animal
- ALXrec3**- Cultura recuperada de lesão de córnea em animal
- ATCC** - *America Type Culture Collection*
- AVL** - Amebas de Vida Livre
- CA** - Ceratite Amebiana
- Corr** – Coeficiente de variação
- DMSO** – Dimetilsulfoxido
- DTT**- Ditioneitol
- EAG** - Encefalite Amebiana Granulomatosa
- ESI** – Ionização eletrospray
- EUA** – Estados Unidos da America
- HCA** – Análise de agrupamento hierárquico
- HIV** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- IEF** – Focalização isoelétrica
- kDa** - kilodaltons
- LC**- Cromatografia Líquida
- MALDI** – Ionização e dessorção assistida por matriz
- MIP133** - Proteína induzida por manose de aproximadamente 133 kDa
- MM** – Massa molecular
- MPB** - Proteína ligadora de manose
- MS** – Espectrometria de massas
- MS/MS** – Análise sequencial de massas/massas
- PBS** – Tampão fosfato-salino
- PCR**- Reação em Cadeia da Polimerase
- PI** – Ponto isoelétrico
- PYG** - Protease peptona, extrato de levedo e Glicose
- qPCR** – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo
- SDS** – Dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE** – Dodecil sulfato de sódio de poliacrilamida
- SFB** - Soro Fetal Bovino
- SNC**- Sistema Nervoso Central
- TCA**- Tricloro acético ácido

TRIS - Tris-hidroximetilaminometano

RESUMO

As amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* são protozoários ubíquos isolados dos mais variados ambientes. Eventualmente, são encontradas causando sérias doenças nos seres humanos. A infecção mais comum causada por esse protozoário é a ceratite amebiana (CA), caracterizada por uma grave inflamação na córnea que pode levar à cegueira. O conhecimento sobre as proteínas parasitárias envolvidas no processo fisiopatológico pode ser útil para desenvolver estratégias de diagnóstico e terapêuticas para CA. Assim, realizou-se de um estudo proteômico comparativo para identificar proteínas diferencialmente expressas por trofozoítos de *Acanthamoeba*, provenientes de cultura de longo prazo e de re-isolados obtidos de lesão da córnea induzida em modelo animal de CA. Para tal, uma cepa de *Acanthamoeba castellanii* isolada de um paciente com CA, mantida em cultura axênica em meio PYG desde 2006, foi utilizada. Ratos Winstar (45 dias) foram utilizados para induzir CA, após a inoculação intraestromal de 10^4 trofozoítos. Com o objetivo de definir qual o método de obtenção de proteínas mais adequado para a análise proteômica, trofozoítos da cepa ALX de longo prazo foram submetidos aos métodos de extração proteica por sonicação e “freeze/thaw” na presença de detergente CHAPS. O método de sonicação mostrou-se mais adequado, resultando em mapas bidimensionais de maior resolução. Para a confecção dos géis bidimensionais das culturas avaliadas, as proteínas totais de ALXlrc, ALXrec1, ALXrec2 e ALXrec3 foram focalizadas em *strips*. Posteriormente, as proteínas já focalizadas foram separadas na segunda dimensão em eletroforese de poliacrilamida. A detecção das proteínas diferencialmente expressas foi realizada através do software ImageMaster 2D Platinum. Sessenta e dois *spots* foram selecionados para a espectrometria de massas, sendo 42 identificados na base de dados específica de *Acanthamoeba*. Destas, oito correspondiam a proteínas hipotéticas com função desconhecida. Análises de função molecular revelaram que a maioria das demais proteínas estão associadas à processos biológicos relacionados à oxirredução e função molecular de ligação à outra proteína. Por intermédio da representação em um *heatmap* da análise de expressão diferencial entre a cultura de longo prazo e culturas recuperadas, foi possível inferir que *Acanthamoeba* modula a expressão de várias proteínas associadas principalmente ao metabolismo energético, à atividade proteolítica, ao controle da expressão gênica, pela degradação de proteínas ou metilação do DNA, à resposta ao estresse e reparo do DNA, para adaptação ao novo ambiente e resistência aos mecanismos imunes do hospedeiro, promovendo lesões teciduais.

Palavras-chave: Proteômica; Ceratite amebiana; *Acanthamoeba*

ABSTRACT

The free-living amoeba of the genus *Acanthamoeba* are ubiquitous protozoa isolated from the most varied environments. Eventually, they are found causing serious illness in humans. The most frequently infection caused by this protozoan is amoebic keratitis (KA), characterized by severe inflammation in the cornea that can lead to blindness. Knowledge about the parasitic proteins involved in the pathophysiological process may be useful to develop diagnostic and therapeutic strategies for CA. Thus, a comparative proteomic study was performed to identify proteins differentially expressed by *Acanthamoeba* trophozoites from long-term culture and from re-isolates obtained from KA-induced in a animal model. For this purpose, a strain of *Acanthamoeba castellanii* isolated from a patient with KA maintained in axenic culture in PYG medium since 2006 was used. Wistar rats were used to induce KA after intraestromal inoculation of 10^4 trophozoites. In order to define the most suitable method of obtaining proteins for the proteomic analysis, trophozoites of the long-term culture ALX were submitted to the methods of protein extraction by sonication and freeze/thaw in the presence of detergent CHAPS. The sonication method was more adequate, resulting in two-dimensional maps of higher resolution. For the preparation of the two-dimensional gels of the evaluated cultures, total proteins of ALXltc, ALXrec1, ALXrec2 and ALXrec3 were focused. Subsequently, the already focused proteins were separated in the second dimension in polyacrylamide electrophoresis. Detection of differentially expressed proteins was performed using ImageMaster 2D Platinum software. Sixty-two spots were selected for mass spectrometry, of which 42 were identified in the *Acanthamoeba* specific database. Of these, eight hypothetical proteins with unknown function could be detected. Molecular function analyzes revealed that most proteins are associated with biological processes related to oxidation and molecular function of binding to the other protein. Through the representation in a heatmap of the analysis of differential expression between long-term culture and re-isolated cultures, it was possible to infer that *Acanthamoeba* modulates the expression of several proteins associated mainly to energy metabolism, proteolytic activity, control of gene expression, protein degradation or DNA methylation, response to DNA stress and repair, adaptation to the new environment, resistance to host immune mechanisms, and promotion of tissue damage.

Keywords: Proteomics; amoebic Keratitis; *Acanthamoeba*

1 INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) constituem um grupo de protozoários amplamente diversos, no qual se incluem algumas espécies que são denominadas anifzóicas, por apresentar potencial patogênico, como *Acanthamoeba*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e *Sappinia pedatta* (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). Anifzóicos são organismos de vida livre que ocasionalmente habitam um hospedeiro causando danos (SIDDIQUI; KHAN, 2012), sendo que as espécies pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* são as mais frequentemente encontradas no ambiente (KHAN, NAVEED AHMED, 2006).

As principais doenças causadas por *Acanthamoeba* são a encefalite amebiana granulomatosa (EAG) e a ceratite amebiana (CA). A EAG é uma das formas mais graves, muito rara e geralmente letal, que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos. A EAG causa um quadro cerebral, em geral, precedido de infecção sistêmica, cuja porta de entrada é o trato respiratório ou a pele (AKPEK *et al.*, 2011). Um aumento considerável no número de casos de CA tem sido observado nas últimas décadas, acometendo principalmente os usuários de lentes de contato. Esta enfermidade afeta indivíduos sem sinal de imunodepressão, sendo caracterizada por uma infecção dolorosa da córnea (KHAN, NAVEED AHMED, 2006; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

O crescente interesse nesse gênero de AVL é evidenciado pelo número de artigos publicados ao longo de décadas, em comparação com outras amebas anifzóicas (**Figura 1**).

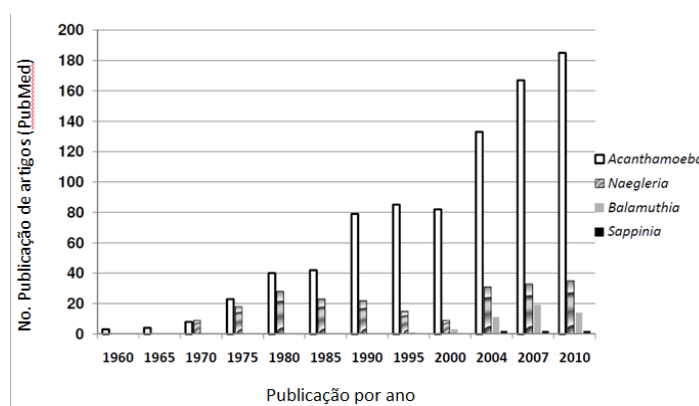


Figura 1: Quantidade de artigos relacionados às amebas anifzóicas publicados em 5 décadas. Fonte: adaptado de SIDDIQUI; KHAN, 2012.

Os mecanismos de invasão e desenvolvimento das doenças causadas por *Acanthamoeba* ainda não foram totalmente esclarecidos, apesar de já se conhecer alguns fatores associados à sua patogenicidade e virulência. A presença de uma proteína de superfície ligadora de manose (MBP) envolvida no passo inicial de invasão e a capacidade de produzir proteases que atuam na degradação do tecido hospedeiro são exemplos desses fatores (CLARKE, DANIEL W.; NIEDERKORN, 2006; KIM, WON TAE *et al.*, 2006).

Os fatores e mecanismos regulatórios que determinam se o protozoário assumirá um estilo de vida livre ou parasitário, ainda são pouco conhecidos. Devido à importância crescente de *Acanthamoeba* como patógeno emergente, novos estudos visando desvendar os mecanismos moleculares que modulam padrões de virulência do protozoário são necessários e urgentes.

1.1 O gênero *Acanthamoeba*

1.1.1 Histórico

Castellani, em 1930, foi o primeiro pesquisador a descrever as amebas do gênero *Acanthamoeba*, ao observá-las em culturas do fungo *Cryptococcus parvulus*. Inicialmente descritas como pertencentes ao gênero *Hartmannella*, foram denominados *Hartmannella castelani*. Para tal classificação taxonômica, as características biológicas dos trofozoítos como os pseudópodes e a dupla camada cística foram consideradas. Somente em 1931 o gênero *Acanthamoeba* foi criado a partir da subdivisão do gênero *Hartmannella* por Volkonsky. O gênero *Acanthamoeba* foi caracterizado pela presença de fusos pontiagudos observados durante a mitose e um cisto de parede dupla com uma camada externa irregular (KHAN, NAVEED AHMED, 2006).

Após décadas de esquecimento, o potencial patogênico dessas amebas passou a atrair a atenção de alguns pesquisadores. Relatos na literatura mostraram a presença de *Acanthamoeba* como contaminante em experimentos de cultura de tecidos (JHANES *et al.*, 1957; CULBERTSON; SMITH; MINNER, 1958). Culbertson em 1959 comprovou pela primeira vez que esses organismos possuíam a capacidade de causar efeito citopático em células de rim de macaco *in vitro*, bem como de causar a morte de animais de laboratório *in vivo* (CULBERTSON; SMITH; MINNER, 1958).

O primeiro caso de infecção por *Acanthamoeba* em humanos foi relatado em 1972 quando um paciente que apresentava a doença de Hodgkin foi diagnosticado *post mortem* com EAG (JAGER; STAMM 1972). Em 1974 os primeiros casos de CA

foram descritos na literatura (NAGINGTON *et al.*, 1974) e, no Brasil, Nosé e colaboradores relataram em 1988 o primeiro caso de lesões ulceradas de córnea geradas por *Acanthamoeba* em usuários de lentes de contato (NOSE *et al.*, 1988; KHAN 2006).

A associação entre *Acanthamoeba* com outros microrganismos, como bactérias, foi primeiramente observada em 1954 (DROZANSKI, 1956; KHAN 2006). A capacidade de servir como um reservatório de microrganismos patogênicos foi inicialmente comprovada por Rowbotham (1980) ao constatar a presença da bactéria *Legionella pneumophila* no interior de espécies de *Acanthamoeba* após experimentos realizados *in vitro*.

1.1.2 **Biologia e morfologia**

As AVL do gênero *Acanthamoeba* são protozoários ubíquos já isolados dos mais variados ambientes tais como poeira, solo, água de rio, mar, alimentos, piscinas, ar-condicionado, além de outros ambientes como estojos e lentes de contato, estação lava-olhos, dentre outros (KHAN, 2006).

O ciclo biológico das amebas do gênero *Acanthamoeba* é relativamente simples, com a presença de duas formas evolutivas: os trofozoítos metabolicamente ativos, que se dividem assexuadamente por divisão binária e os cistos como a sua forma de resistência (KHAN, 2006).

Os trofozoítos possuem um formato ameboide e medem aproximadamente de 20 a 40µm de comprimento, podendo variar entre as diversas espécies. Normalmente é uninucleado com citoplasma granular, apresentando organelas citoplasmáticas como complexo de Golgi, retículo endoplasmático liso e rugoso, ribossomos, mitocôndria, microtúbulos, vacúolos digestivos e um vacúolo contrátil (**Figura 2**), esse último, responsável pelo controle do conteúdo de água na célula. A composição do citoplasma trofozoítico consiste de 33% de proteínas, 25% de fosfolípidos, 13% de esteróis e 29% de lipofosfoliglicano. Apresentam estruturas de superfície abundantes em forma de espinho denominadas acantopódios (**Figura 2**), cuja função é de adesão, alimentação e movimentação (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; KHAN, 2006; SIDDIQUI; KHAN, 2012). Os trofozoítos alimentam-se de bactérias, fungos, algas e leveduras, por meio do mecanismo de fagocitose e também são capazes de alimentarem-se de matéria orgânica líquida por pinocitose (BOWERS; KORN, 1968; KHAN, NAVEED A., 2001; KHAN, NAVEED AHMED, 2006; KHAN, NAVEED AHMED; SIDDIQUI, 2014).

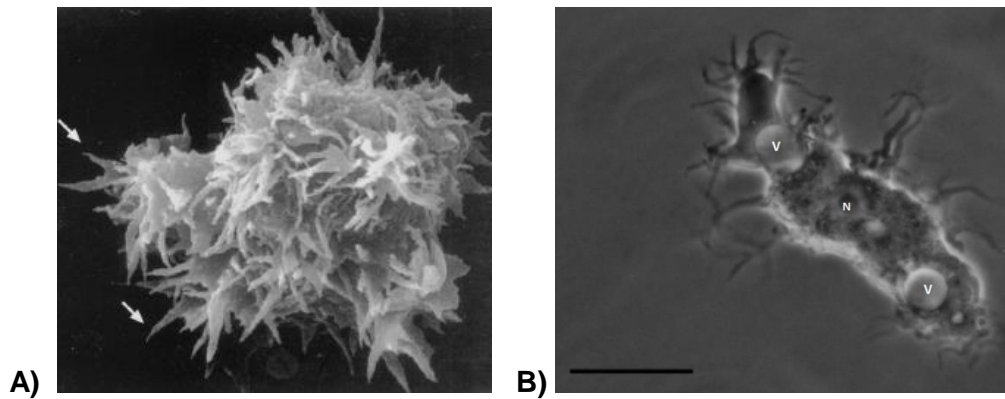


Figura 2: Trofozoítos de *Acanthamoeba*. (A) Microscopia eletrônica de varredura, as setas brancas indicam os acantopódios. (B) Microscopia de contraste de fase, núcleo (N) e vacúolos (V). Barra: 20 μ m. Fonte: adaptado de MARCIANO-CABRAL; CABRAL 2003; COSTA, *et al.*, 2010.

As condições ideais para a manutenção das amebas, nesse estágio evolutivo, são abundância de alimento, pH neutro, temperatura em torno de 30°C, e osmolaridade entre 50-80 mOsmol (KHAN, NAVEED AHMED, 2006; LORENZO-MORALES *et al.*, 2006). Ao serem expostos a condições desfavoráveis como aumento ou diminuição do pH, aumento ou diminuição da temperatura, ausência de alimento, dentre outras, os trofozoítos passam pelo processo de encistamento reduzindo drasticamente o seu metabolismo. Durante esse processo os trofozoítos expõem substâncias como água e alimentos e se condensam em uma estrutura arredondada denominada pré-cisto (KHAN, 2006; VIVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). Os níveis celulares de RNA, proteínas, triglicérides e glicogênio diminuem reduzindo assim o volume celular e o peso seco desse protozoário (WEISMAN, 1976; KHAN, 2006; SIDDIQUI; KHAN, 2012). O encistamento, em determinadas situações, pode ser utilizado pelas amebas como mecanismo de defesa contra micro-organismos invasores, tal como mimivírus (BORATTO *et al.*, 2015). A habilidade que possuem para encistar-se explica a sua ubiquidade no meio ambiente (AL-HERRAWY *et al.*, 2013).

Os cistos maduros de *Acanthamoeba* exibem uma camada interna (endocisto) e uma camada externa (ectocisto) (**Figura 3**), estruturas que auxiliam na manutenção da sua viabilidade durante anos (MAZUR; HADAS, 1996; KHAN, 2006).

Os cistos apresentam poros especializados, denominados ostíolos, que funcionam como sensores monitorando alterações no micro-ambiente (VIVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). Diversos estudos demonstraram a sobrevivência e manutenção da viabilidade cística, mesmo após exposição à radiação, temperaturas

extremas, agentes biocidas, soluções para limpeza de lentes de contato, hipoclorito de sódio, dentre outros (MARCIANO-CABRAL; CABRAL 2003; KHAN, 2006; VIVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

Os cistos de *Acanthamoeba* medem aproximadamente de 13-23 μm e podem ser facilmente veiculados pelo ar. Essas características configuram o quadro de fácil dispersão, contribuindo diretamente para a disseminação das infecções causadas por esse protozoário (KHAN, 2006; VIVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

1.1.3 Classificação morfológica e molecular

A classificação taxonômica atual inclui as amebas do gênero *Acanthamoeba* como pertencentes ao Reino Protista, sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, subfilo Sarcodina, superclasse Rhizopoda, classe Lobosea, Sub-classe Gymnamoebia, ordem Amoebida e família Acanthamoebidae. (LEVINE *et al.*, 1980; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

Cerca de 20 espécies já foram descritas com base na morfologia cística (DUARTE *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2010). Pelo menos oito espécies do gênero *Acanthamoeba* já foram relacionadas à casos de ceratite em humanos, sendo as mais relevantes *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga* e *Acanthamoeba culbertsoni* (NIEDERKORN *et al.*, 1999; VIVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; MAGNET *et al.*, 2014). Na EAG, as espécies mais relatadas são *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba culbertsoni* e *Acanthamoeba healyi* (BOOTON *et al.*, 2005; VIVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; AZZAM *et al.*, 2015). A determinação de espécies, no entanto, não é atualmente utilizada para fins de diagnóstico, pois a distinção pelo critério morfológico baseado nos cistos é muito difícil e depende de técnica de coloração complexa (impregnação por prata) para que possa ser feito a contagem do número médio de braços do endocisto e de ostíolos, o que torna o método inviável (PUSSARD; PONS, 1977; PAGE, 1988). Além disso, pode haver variação morfológica inespecífica gerada pelas condições de cultivo (COSTA *et al.*, 2010; DUARTE *et al.*, 2013; SIDDIQUI; KHAN, 2012). Há uma classificação morfológica simplificada que agrupa as diferentes espécies nos grupos I, II e III (PUSSARD E PONS, 1977). Ao grupo I pertencem os cistos grandes que possuem de 16 a 30 μm de diâmetro, apresentam o endocisto de aspecto estrelado e o ectocisto com contorno circular liso ou ondulado (**Figura 3 A**). No grupo II, os cistos possuem um diâmetro menor ou igual a 18 μm , o endocisto de aspecto levemente estrelado, oval ou poliédrico e o ectocisto segue o contorno do endocisto (**Figura 3 B**). No grupo III estão os cistos com diâmetro menor ou igual a 18 μm , que possuem o

endocisto oval ou levemente angular e o ectocisto fino, liso ou levemente ondulado (**Figura 3 C**) (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; VIVESVARA *et al.*, 2008; DUARTE *et al.*, 2013).

Os critérios morfológicos de classificação baseado nos grupos I, II e III têm sido atualmente associados à genotipagem por meio da análise de sequências gênicas do 18S rDNA. Sotdhardt e colaboradores (1998) realizaram um estudo em 53 isolados e puderam determinar a existência de 12 genótipos (T1 a T12). Existem pelo menos 5% de variabilidade nas sequências entre os genótipos. Todas as 12 regiões variáveis dentro do 18S rDNA devem ser consideradas para a determinação de um novo genótipo (CORSARO; VENDITTI 2011). A utilização de sequências altamente variáveis desse gene é suficiente para diferenciá-los (SCHOROEDER, *et al.*, 2001). Desde a proposta inicial para a classificação genotípica de *Acanthamoeba* por critérios moleculares, 8 genótipos adicionais já foram descritos, totalizando 20 genótipos reconhecidos (CORSARO *et al.*, 2015; MAGNET *et al.*, 2014).

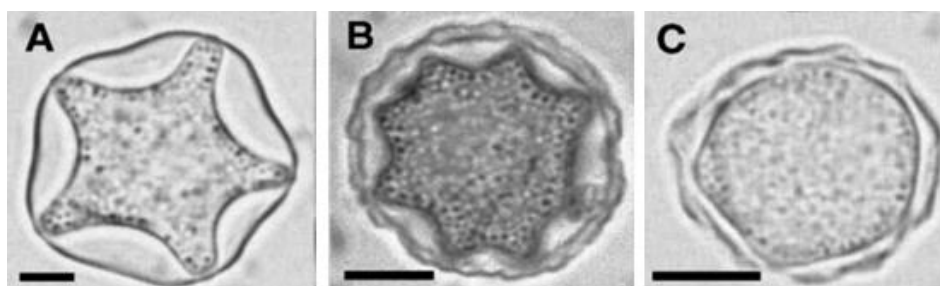


Figura 3: Cistos de *Acanthamoeba* segundo classificação morfológica de Pussard e Pons (1977). A) Cistos pertencentes ao grupo I, B) Cistos pertencentes ao grupo II, e C) Cistos pertencentes ao grupo III. Barra = 5µm
Fonte: adaptado de TURNER *et al.*, 2015.

Como a identificação da espécie por critérios morfológicos não é utilizada, os estudos com novos isolados normalmente incluem apenas a identificação de *Acanthamoeba* sp. (NIEDERKORN *et al.*, 1999; MAGNET *et al.*, 2014). O genótipo T4 é o mais prevalente no ambiente e também o mais associado aos casos de EAG e a mais de 90% dos casos de CA (CORSARO *et al.*, 2015; MAGNET *et al.*, 2014; SIDDIQUI; KHAN, 2012). Acredita-se que as amebas desse grupo possuam fatores de virulência característicos que aumentam sua capacidade de infecção (KHAN, 2012; MACIVER *et al.*, 2013; SIDDIQUI).

1.2. Infecções por *Acanthamoeba*

1.2.1 *Encefalite Amebiana Granulomatosa*

A EAG é uma doença rara do sistema nervoso central (SNC) de curso lento e progressivo, e que tem uma letalidade de 90% (MASSILAMANY; REDDY, 2011). Afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos, portadores de doenças como diabetes, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), dentre outras. Outro grupo de risco são indivíduos usuários de drogas de abuso e alcoolistas. Determinar a epidemiologia de EAG não é fácil, pois, na maioria dos casos, trata-se de uma doença secundária de difícil diagnóstico. Nos EUA estima-se a ocorrência de 1,57 mortes em 10.000 por EAG em indivíduos portadores do vírus HIV/AIDS. Em países de clima quente esses números podem ser ainda maiores (KHAN, 2006; VIVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

Acredita-se que a entrada das amebas ocorra pela nasofaringe com colonização do pulmão e posterior disseminação hematogênica, atingindo o encéfalo. Outra porta de entrada são lesões na pele. As infecções cutâneas são caracterizadas por nódulos e ulcerações da pele, onde podem ser encontrados cistos e trofozoítos, que alcançam o sistema circulatório, passam pela barreira hematoencefálica e conseqüentemente, atingem o encéfalo (KHAN, 2006; AKPEK *et al.*, 2011; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

A EAG é caracterizada por grandes áreas de necrose hemorrágica e edema no cérebro, evidenciadas por necrópsia dos pacientes (**Figura 4**). Os sintomas são inespecíficos e podem facilmente ser confundidos com outras infecções que acometem o SNC como, por exemplo, a meningite. Os sintomas clínicos incluem dor de cabeça, febre, mudanças comportamentais, náuseas, vômitos, déficits neurológicos, letargia, hemiparesia, convulsões, aumento da pressão intracraniana (MARCIANO-CABRAL, 2003; KHAN, 2006; VIVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

O diagnóstico pode ser estabelecido por meio da associação do quadro clínico com exames complementares, como por exemplo, tomografia computadorizada e ressonância magnética. Exames como punção e análise do líquido cefalorraquidiano também podem auxiliar no diagnóstico, no entanto, a coloração utilizada não é específica para a visualização dos trofozoítos ou cistos presentes na amostra. A confirmação diagnóstica se faz pela identificação de *Acanthamoeba* por meio do cultivo de biópsia do tecido cerebral em meio de cultura ou visualização direta em cortes histológicos (MARTINEZ; VIVESVARA, 1991).

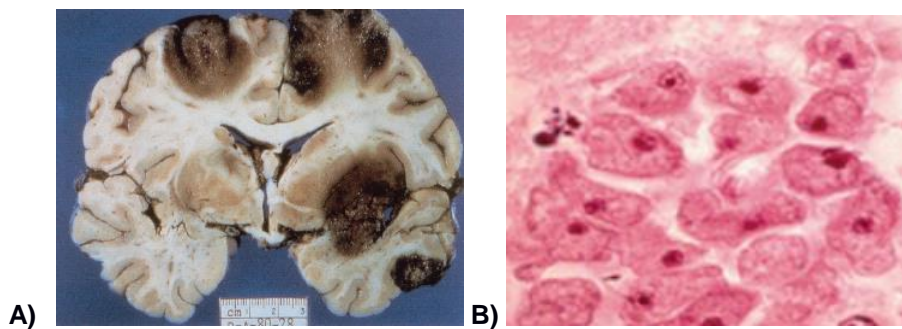


Figura 4: Corte anatômico e histológico de regiões cerebrais de pacientes com EAG. A) Corte coronal do cérebro *post mortem* evidenciando as áreas de necrose cortical e subcortical em caso de EAG por *Acanthamoeba*. B) Corte histológico da região cortical demonstrando a presença de trofozoítos de *Acanthamoeba*. Fonte: adaptado de MARTINEZ, 1982; VIVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007.

Durante um quadro de EAG altos títulos de anticorpos específicos contra *Acanthamoeba* são produzidos. No entanto, testes sorológicos não devem ser utilizados na rotina diagnóstica pois títulos altos também são detectados em indivíduos saudáveis, possivelmente devido ao intenso contato entre humanos e amebas (KHAN, 2006). As técnicas moleculares podem definir o diagnóstico, porém, o alto custo limita o acesso (DA ROCHA-AZEVEDO; TANOWITZ; MARCIANO-CABRAL, 2009).

Não existe um tratamento eficaz e recomendado para EAG, sendo mais utilizado a combinação de antimicrobianos, antifúngicos e anti-inflamatórios. O insucesso da maioria dos tratamentos se deve à baixa sensibilidade das amebas aos agentes antimicrobianos e à incapacidade desses em atravessar a barreira hematoencefálica (KHAN, 2006; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

1.2.2 *Ceratite amebiana*

A ceratite por *Acanthamoeba* ou ceratite amebiana (CA) é caracterizada por uma inflamação na córnea devido à presença dos protozoários e, ao contrário da EAG, afeta indivíduos imuno-competentes. Os primeiros casos foram registrados no Reino Unido durante a década de 1970. A partir de 1980 houve um considerável aumento na incidência dessa infecção e, a esse fato, atribui-se o crescimento dos usuários de lentes de contato. Esses indivíduos são 80 vezes mais susceptíveis ao desenvolvimento de ceratite do que aqueles que não utilizam lentes de contato (NAGINGTON *et al.*, 1974; ALVORD *et al.*, 1998; STAPLETON *et al.*, 2009; LORENZO-MORALES *et al.*, 2013).

Observou-se que alguns fatores de risco como uso de soluções salinas feitas com sal de cozinha para a limpeza das lentes de contato, o uso por um longo período de tempo, falta de higiene pessoal, manutenção inadequada, formação de biofilme na superfície das lentes e exposição à água contaminada, estão associados ao desenvolvimento de CA. Micro-traumas constituem também um importante fator para o desenvolvimento da infecção, visto que a ceratite amebiana não acomete córneas íntegras (NIEDERKORN *et al.*, 1999; STAPLETON *et al.*, 2009; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

A incidência da CA é variável entre as diferentes regiões geográficas. Trabalhos como os desenvolvidos por Moriyama e Hofling-lima, (2008), Duarte e colaboradores (2013) e Marujo e colaboradores (2013) relatam casos de CA no Brasil. Um importante trabalho desenvolvido no Brasil entre 1987 e 2006, com 581 pacientes suspeitos de CA e 185 confirmados, demonstrou o aumento do número de casos de pacientes suspeitos e com a doença diagnosticada (**Figura 5**) (CARVALHO *et al.*, 2009).

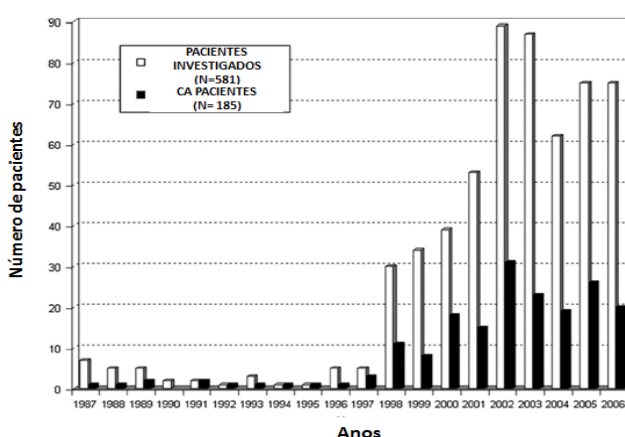


Figura 5: Relação entre o número de pacientes investigados e casos confirmados de Ceratite Amebiana entre os anos de 1987 – 2006, em São Paulo, Brasil. Revisão realizada através de registros clínicos e laboratoriais fornecidos pelo departamento de oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Fonte: adaptado de Carvalho *et al.*, 2009.

A CA determina um quadro de dor com fotofobia, olhos vermelhos, visão embaralhada, sintomas comuns à outras ceratites infecciosas (**Figura 6 A**). Também são observados lacrimejamento excessivo, edema, infiltrado inflamatório estromal em forma de anel (**Figura 6 B**) e ceratoneurite, causada pela presença de trofozoítos em torno dos nervos da córnea, o que gera uma dor extremamente forte (KHAN, 2006; DART; SAW; KILVINGTON, 2009; LORENZO-MORALES *et al.*, 2013).

A semelhança do quadro clínico com outras infecções causadas por microrganismos dificulta muito o diagnóstico de CA. Na fase inicial pode ser confundida com ceratites virais como a ceratite dendrítica causada pelo vírus herpes simplex ou adenovírus e também ceratites bacterianas. Na fase avançada pode ser confundida por ceratites fúngicas ou úlcera de córnea (SIDDIQUI; KHAN, 2012; LORENZO-MORALES; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015). O diagnóstico definitivo é realizado por meio da visualização dos trofozoítos e cistos diretamente na córnea, por microscopia confocal ou cultura de raspado de córnea, sendo este o padrão ouro para diagnóstico de CA. Testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) podem ser associados para determinação de espécies e genótipos o que aumenta a sensibilidade dos resultados. Nos casos de cultura negativa o diagnóstico molecular torna-se indispensável visto que o diagnóstico sorológico não pode ser utilizado (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; MAYCOCK; JAYASWAL; ED, 2016)

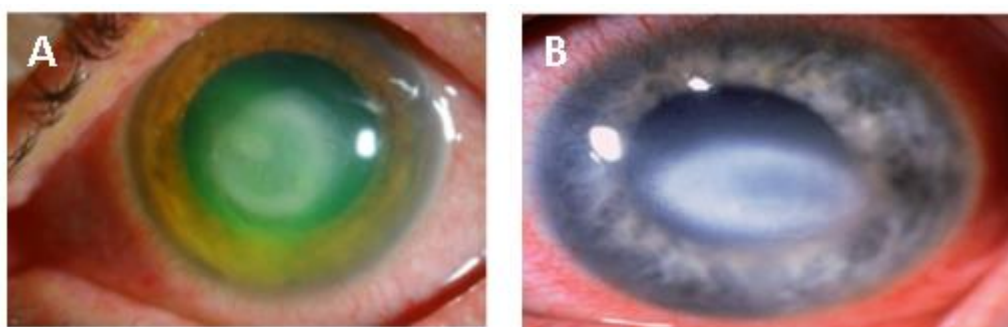


Figura 6: Aspecto do olho de pacientes acometidos por ceratite por *Acanthamoeba* A) Conjuntiva apresentando hiperemia e infiltrado inflamatório em forma de anel. B) Infiltrado estromal em forma de anel característico Fonte: adaptado de MAYCOCK;JAYASWAL, 2016; KHAN, 2006.

Os trofozoítos são sensíveis à muitos quimioterápicos como antibióticos, antissépticos, antifúngicos e antiprotozoários. No entanto os cistos são resistentes à muitos desses agentes químicos, dificultando o tratamento mesmo com o diagnóstico precoce da doença. Atualmente o tratamento aplicado visa a eliminação das duas formas para que não ocorra recidiva da doença devido à não eliminação das formas císticas. Não existe um único procedimento ou um único medicamento para tratar CA. A associação de antimicrobianos tópicos com antifúngicos tópicos ou sistêmicos vem sendo utilizada. As diamidinas e biguanidas são as drogas mais eficazes para eliminar trofozoítos e cistos viáveis da córnea (SCHUSTER; VIVESVARA, 2004; MARTÍN-NAVARRO *et al.*, 2013; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015). A duração do tratamento é variada e depende da fase em que a CA foi diagnosticada. Um estudo realizado por Raford e colaboradores (1998), no Reino Unido, demonstrou

que, em média, são necessários seis meses de tratamento. Com o diagnóstico tardio e consequente evolução do quadro clínico para perfuração da córnea ou abscessos fulminantes, o transplante é recomendado, no entanto, recidivas podem ocorrer meses após o término do tratamento (DART; SAW; KILVINGTON, 2009).

1.2.2.1 Fisiopatogenia da ceratite amebiana

São vários os fatores associados à patogenicidade e virulência de *Acanthamoeba*. Por exemplo, a capacidade de sobrevivência dos trofozoítos e cistos à alta osmolaridade dos olhos devido a salinidade das lágrimas. Outros estudos demonstraram a capacidade de crescimento em altas temperaturas e pH variados (KHAN *et al.*, 2001; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015). Essas características têm sido associadas com o potencial patogênico das cepas de *Acanthamoeba*, no entanto, os mecanismos são ainda desconhecidos e vem despertando interesse dos pesquisadores (COSTA *et al.*, 2010; DUARTE *et al.*, 2013; KHAN, NAVEED A.; PAGET, 2002; KHAN, NAVEED AHMED; TAREEN, 2003).

A primeira fase da infecção se dá com a aderência dos trofozoítos às células epiteliais da córnea, o que instala um processo inflamatório local desencadeando morte celular e fagocitose do parasito (NIEDERKORN *et al.*, 1999; KHAN, 2006).

Os trofozoítos se ligam à glicoproteínas de manose presentes no epitélio da córnea hospedeira através da proteína ligadora de manose (MBP) de 136 kDa da membrana trofozoítica (**Figura 7 A**). Micro-traumas levam ao aumento da expressão de glicoproteínas de manose no epitélio da córnea, sendo esse um fator de risco determinante para a instalação da doença. A exposição de trofozoítos de *Acanthamoeba* a manose induz aumento da expressão de uma protease de 133 kDa, conhecida como MIP133. A MIP133 é um fator citopático que atua pela indução de apoptose em queratinócitos, células do corpo ciliar, células epiteliais do pigmento de retina, células do epitélio da córnea e células endoteliais da córnea (**Figura 7 B e C**) (CLARKE, DANIEL W.; NIEDERKORN, 2006b).

Uma intensa dor é relatada por pacientes com CA e acredita-se que seja devido a produção da Ceratoneurite radial causada pelo acúmulo dos trofozoítos próximos aos nervos da córnea (**Figura 7 E**). Os trofozoítos em sua maioria não penetram a nível intraocular (**Figura 7 F**). Clarke e colaboradores (2005), em experimentos *in vivo*, demonstraram que os trofozoítos que conseguem penetrar a esse nível são eliminados por um intenso infiltrado inflamatório. As proteases são fatores de virulência já identificados em diversos microrganismos como vírus, bactérias e protozoários. Os trofozoítos de *Acanthamoeba* utilizam proteases, tais como serino

proteases, cisteíno proteases, elastase e metaloproteases, para invadir o estroma (**Figura 7 D**) (CLARKE; NIEDERKORN, 2006). Proteases secretadas por *Acanthamoeba* apresentam capacidade de degradar diversos componentes da matriz extracelular. Kong e colaboradores (2000) identificaram uma serinoprotease de 33kDa em uma cepa do genótipo T12, com a capacidade de degradar fibrinogênio, IgG, IgA, albumina, hemoglobina, além de também degradar os principais componentes da matriz extracelular: colágeno tipo I, colágeno tipo IV e fibronectina. Cepas patogênicas exibem proteases específicas, como o ativador de plasminogênio de 40 kDa, que não são encontradas em cepas ambientais (MITRO *et al.*, 1994). As metaloproteases de matriz são enzimas proteolíticas que também possuem papel importante para a degradação de componentes da matriz extracelular no processo de invasão por *Acanthamoeba* (CLARKE; NIEDERKORN, 2006).

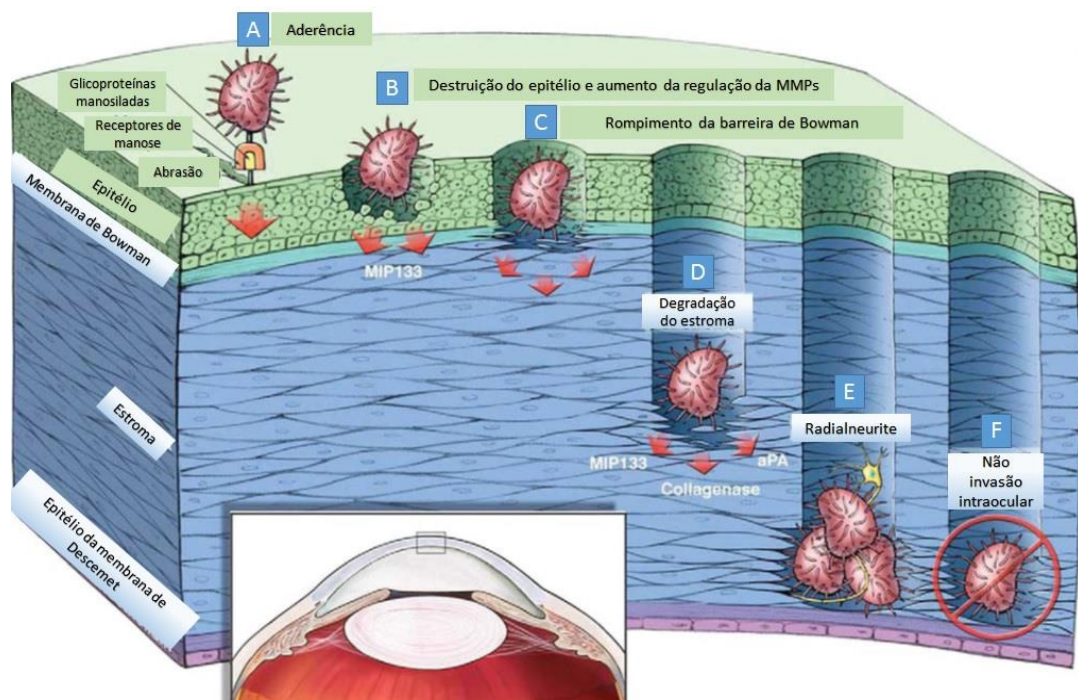


Figura 7: O processo de invasão da córnea por *Acanthamoeba*. A) Os trofozoítos aderem-se ao epitélio da córnea. B) Destruição do epitélio pela ação da protease MIP133. C) Rompimento da membrana de Bowman e invasão do estroma. D) Degradação do estroma pela ação de diversas proteases. E) Acúmulo de trofozoítos próximos ao nervo da córnea causando ceratoneurite. F) Incapacidade dos trofozoítos em penetrar a nível intraocular. Fonte: adaptado de CLARK; NIEDERKORN, 2006).

Nesse contexto, as proteases em *Acanthamoeba* são fundamentais para que essa ameba de vida livre obtenha sucesso ao infectar e colonizar um hospedeiro. No entanto, ainda existem muitos fatores do mecanismo molecular que regula a patogenicidade em *Acanthamoeba* que necessitam de um maior entendimento.

1.3 Proteômica

Proteoma é o termo referente ao conjunto de proteínas expressas em um organismo, célula ou tecido em condições e tempo determinados (VERCAUTEREN; ARCKENS; QUIRION, 2007). O proteoma de um organismo se mostra altamente variável em decorrência das respostas adaptativas às mudanças do meio, diferentemente do seu genoma que é relativamente estável. Sabe-se que o genoma humano possui aproximadamente 25.000 genes e estima-se que o proteoma humano possua em torno de 100.000 proteínas codificadas, o que indica a sua imensa complexidade. O *splicing* alternativo é um dos processos celulares responsável por essa diversidade. Através desse mecanismo são geradas isoformas proteicas que apresentam diferentes domínios funcionais (GRIFFITHS *et al.*, 2012). Configuram ainda evidências dessa complexidade, as modificações pós-traducionais que estão diretamente relacionadas à função de uma proteína. Tais eventos podem determinar o estado ativo, a localização celular e também a interação com outras proteínas. Além disso, há o dinamismo e variação da concentração de determinada proteína ou grupos proteicos ao longo do tempo (DONATO *et al.*, 2011; KUSSMANN; RAYMOND; AFFOLTER, 2006).

O conceito de proteômica foi estabelecido em 1995 e pode ser definido como o conjunto de estratégias analíticas aplicadas para o estudo de um proteoma. A análise proteômica responde questões como concentração relativa de um produto gênico expresso e em quais circunstâncias ele pode ser expresso. Modificações pós traducionais podem ser estudados se aplicadas determinadas abordagens proteômicas (AEBERSOLD; MANN, 2016; VERCAUTEREN; ARCKENS; QUIRION, 2007; WASINGER *et al.*, 1995; WILKINS *et al.*, 2006). A proteômica permite obter perfis de expressão comparativos entre diferentes condições como um tratamento ou a exposição à algum fator químico ou físico, obtendo assim uma matriz de dados semi-quantitativos de expressão diferencial de milhares de proteínas simultaneamente (WILKINS *et al.*, 2006; VERCAUTEREN; QUIRION, 2006). As proteínas são as biomoléculas que atuam diretamente na expressão do fenótipo e o estudo do proteoma pode revelar aspectos dos mecanismos moleculares e de interação proteína-proteína importantes para manifestação fenotípica. Inúmeros estudos proteômicos são aplicados na caracterização de doenças, de microrganismos infecciosos e na busca por biomarcadores para aplicação no diagnóstico e acompanhamento de quadros patológicos (AEBERSOLD; MANN, 2016; CAUMO *et al.*, 2014; COELHO *et al.*, 2017; PEDERSEN *et al.*, 2017).

Basicamente duas estratégias metodológicas são aplicáveis à técnica de proteômica, *Bottom-up* e *Top-down*. *Bottom-up* consiste na identificação proteica a partir de peptídeos. Nessa técnica, as proteínas são inicialmente fragmentadas em peptídeos para posterior análise no espectrômetro de massas (MS). Geralmente a enzima de escolha para a quebra das ligações peptídicas é a tripsina, que possui sítios de clivagem nos resíduos de lisina e arginina (AEBERSOLD; MANN, 2016; ERIKSSON; FENYÖ, 2007). *Bottom-up* é a abordagem mais frequentemente usada para análises proteômicas e é basicamente dividida em dois passos: a separação das proteínas que pode ser realizada por eletroforese bidimensional (2DE), cromatografia líquida (LC) e eletroforese capilar, seguida pela identificação da identidade proteica através da espectrometria de massas (MS) (ASHTON *et al.*, 2001; AEBERSOLD; MANN, 2016). *Top-down* consiste na identificação de proteínas intactas sem a sua fragmentação prévia. Essa técnica permite o estudo de isoformas proteicas com grande precisão, no entanto é aplicada para o estudo de proteínas individuais pela falta de métodos de fracionamento de proteínas intactas bem integrados a espectrometria de massa (AEBERSOLD; MANN; 2016; TRAN *et al.*, 2011).

1.3.1 Eletroforese Bidimensional (2DE)

A eletroforese bidimensional é uma técnica robusta para detecção e análise de misturas de extratos proteicos complexos oriundos de células, tecidos e amostras biológicas. Combinando *strips* de diferentes faixas de pH é possível detectar até 5000 *spots* proteicos distintos (VOSHOL; AG, 2000). Com o emprego de faixas de pH mais amplas como de 3-10 e 4-7 é possível a detecção de mais de 2000 *spots* (WILDGRUBER *et al.*, 2000). Pela técnica de 2DE, tanto análises semi-quantitativas quanto quantitativas podem ser desenvolvidas (O'FARRELL, 1975; ROGOWSKA-WRZESINSKA *et al.*, 2013; WILKINS *et al.*, 1996). Estudos comparativos que visem à detecção de mudanças no perfil de expressão de proteínas são possíveis por meio da comparação dos padrões de *spots* apresentados nos mapas de géis bidimensionais. Diferentes tipos celulares e tecidos apresentam mapas bidimensionais de proteínas característicos, permitindo a rápida validação de protocolos de extração de proteínas pela comparação dos géis experimentais com mapa bidimensional padrão já existentes (APPEL *et al.*, 1996; ROGOWSKA-WRZESINSKA *et al.*, 2013; WILKINS *et al.*, 1996).

Na 2DE as proteínas são separadas por duas propriedades físico-químicas, o ponto isoelétrico (*pI*), por meio da focalização isoelétrica (IEF), e pela sua massa molecular (MM), por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliácridamida (SDS-PAGE). O *pI* de uma proteína é o pH específico no qual a somatória das cargas dos

aminoácidos é zero. Na focalização isoelétrica as proteínas migram por um gradiente de pH até atingirem o seu *pI*. Proteínas carregadas positivamente se movem em direção ao cátodo e as carregadas negativamente movem-se em direção ao ânodo. Nesse sistema, é aplicada uma alta voltagem para promover a migração das proteínas em direção ao seu *pI*.

O'Farrel em 1975 apresentou a eletroforese bidimensional em um estudo com a bactéria *Escherichia coli* onde foi possível a detecção de 1000 *spots*. Na técnica original a IEF era realizada em géis de poli(acrilamida) cilíndricos polimerizados no interior de tubos de vidro e o gradiente de pH era estabelecido pela migração diferencial de anfólitos. Os anfólitos não eram ligados covalentemente à poli(acrilamida) e havia muita variação na formação do gradiente de pH, o que gerava baixa reprodutibilidade. Estas limitações resultaram no esquecimento da técnica por anos, com o desenvolvimento de tiras de poli(acrilamida) com gradientes de pH imobilizados (IPG), nas quais os anfólitos encontram-se ligados covalentemente à poli(acrilamida) formando um gradiente de pH estável, foi possível aumentar a reprodutibilidade dos resultados (GORG *et al.*, 2000; O'FARRELL, 1975; ROGOWSKA-WRZESINSKA *et al.*, 2013).

Após a separação proteica pelo IEF, as proteínas são submetidas à separação em função de sua massa molecular em sistema de eletroforese em géis de poli(acrilamida) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS). As proteínas de maior peso molecular encontram-se na parte superior do gel e as de menor peso molecular são visualizadas na parte inferior do gel. Os *spots* gerados correspondem às proteínas da amostra. A ausência, presença ou diferença de intensidade entre os *spots* fornecem importantes informações sobre expressão estágio-específicas. Os *spots* são então excisados, digeridos com tripsina e analisados por espectrometria de massa para determinação de sua possível identidade com base em banco de dados (ASHTON *et al.*, 2001; WRZESINSKA *et al.*, 2013).

O preparo adequado da amostra é extremamente relevante para sucesso do fracionamento das proteínas, assim, a escolha do método para a obtenção do extrato proteico é crucial. Existem métodos de lise branda e métodos mais vigorosos. Um exemplo amplamente utilizado de método de lise branda é por congelamento e descongelamento (LENSTRA; BLOEMENDAL, 1983). Nessa abordagem a lise ocorre pela submissão da amostra a ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento geralmente em banho úmido a uma temperatura que não ultrapasse 30°C (TODA *et al.*, 1994; TOLEDO *et al.*, 2010). Métodos de lise mais intensos como a sonicação ondas de ultrassom lisam as células e pode haver degradação de proteínas

pelo aquecimento da amostra, logo a utilização dessa técnica é atrelada ao uso de gelo para manter a integridade da amostra (CAUMO *et al.*, 2014; COELHO *et al.*, 2017; TEIXEIRA-GOMES *et al.*, 1997).

A técnica de 2DE requer utilização de alta concentração de uréia. A uréia é um agente caotrópico que age no desdobramento das proteínas, em conjunto com a tiouréia aumenta principalmente a capacidade de solubilização de proteínas hidrofóbicas (MOLLOY *et al.*, 1998; RABILLOUD, 1998). Detergentes não iônicos, como o triton X-100, ou zwitteriônicos, como o CHAPS, são empregados para evitar a agregação proteica que ocorre através de interações hidrofóbicas (O`FARRELL, 1975; PERDEW; SCHAUP; SELIVONCHICK, 1983; RABILLOUD, 1998). Os reagentes redutores como o ditioneitol (DTT) são necessários para a manutenção do estado reduzido e desnaturado das proteínas, pois promove a quebra de pontes dissulfeto (WRZESINSKA *et al.*, 2013).

Moléculas como lipídeos, fosfolipídeos e sais, podem interferir na focalização isoeletrica por serem carregadas negativamente e migrarem em direção ao ânodo. A presença de sal na amostra aumenta a condutividade da amostra causando interferência na focalização isoeletrica. Além de concentrar as proteínas, a precipitação em tricloro ácido TCA/acetona auxilia na remoção desses contaminantes aumentando a qualidade da IEF (CAUMO *et al.*, 2014; GUY; PHILIP; TAN, 1994).

A técnica de eletroforese bidimensional possui algumas desvantagens dentre elas a mais importante é a reprodutibilidade dos géis gerados e a dificuldade de automação. Todas as etapas, desde o preparo das soluções devem ser rigorosamente controladas para obter géis com parâmetros bons de qualidade de separação e melhorar a reprodutibilidade entre os géis. Para aumentar a confiabilidade nos resultados, pelo menos três réplicas de gel devem ser feitos para cada amostra e submetidos à análise estatística. Mesmo com a automação baixa e um grande número de etapas, a eletroforese bidimensional é uma boa ferramenta para a resolução de um grande número de proteínas de uma amostra complexa (WRZESINSKA *et al.*, 2013).

1.3.2 Espectrometria de Massas (MS)

A espectrometria de massas configura uma das mais importantes metodologias analíticas da proteômica. Os métodos baseados na identificação por espectrometria de massas permitem uma análise sistemática do proteoma sendo possível determinar a

massa molecular de compostos com grande precisão (AEBERSOLD *et al.*, 2016; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Um espectrômetro de massas é fundamentalmente composto por uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. A escolha do método de ionização e dos analisadores de massa depende do objetivo do estudo em questão, existem diversos tipos com características distintas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE 2006). Para a detecção dos íons gerados em um espectrômetro de massas, a medida utilizada é a razão da massa sobre a carga (m/z) dos compostos. Logo, a identificação de proteínas por espectrometria de massas somente foi possível com o desenvolvimento das técnicas de ionização como MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) e ESI (*Electrospray Ionization*) (AEBERSOLD *et al.*, 2016; DI PALMA *et al.*, 2012).

Na técnica de MALDI, geralmente utilizada em associação com 2DE, os peptídeos previamente digeridos com tripsina são cristalizados junto a uma matriz, por exemplo, de ácido alfa-hidroxicinâmico e fixados em uma placa metálica. A incidência um laser sobre a matriz que transfere a energia recebida para os peptídeos faz com que eles sejam ionizados (ASHTON *et al.*, 2001; VEENSTRA, 2006).

O método de ionização do tipo *electrospray* (ESI) opera em pressões próximas à pressão atmosférica e, geralmente é precedido por técnicas de separação do tipo LC. Na ESI a amostra entra em uma fonte de íons por um tubo capilar de aço e na extremidade desse capilar um potencial elevado em relação a um contra-eletrodo é aplicado gerando uma diferença de potencial de 2-5 kV. Ao deixar o tubo capilar de aço o líquido forma um aerossol de gotículas carregadas. Um fluxo de gás nebulizador faz com que o solvente evapore diminuindo assim o volume das gotículas e consequentemente concentrando os íons carregados da amostra. Ao atingir um ponto crítico, onde a repulsão eletrostática dos íons é maior do que a tensão superficial, ocorre a explosão coulômbica formando gotículas carregando um único íon que é direcionado para o analisador de massas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006; PALMA *et al.*, 2012).

1.3.3 Estudos do proteoma de *Acanthamoeba*

A combinação das técnicas mencionadas vem sendo utilizada para estudar o perfil global de proteínas de *Acanthamoeba*. Boyer e colaboradores (2009) realizaram o primeiro estudo proteômico para comparar cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*. Com a utilização da técnica de 2DE identificaram 5 proteínas específicas de cada forma evolutiva. Proteases importantes no processo de encistamento foram

descritas nesse trabalho como a serino protease do tipo subtilisina, expressa somente durante o encistamento. Foi demonstrado também a indução e repressão de proteínas envolvidas na via glicolítica durante o encistamento (BOUYER *et al.*, 2009).

Caumo e colaboradores (2014) confeccionaram um mapa proteômico de trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* e identificaram 184 proteínas por 2DE e 94 por LC. Em ambas as técnicas a maioria das proteínas detectadas estão envolvidas nos processos metabólicos e quase metade possuem a função molecular de ligação ao DNA. Pela eletroforese bidimensional algumas isoformas proteicas puderam ser detectadas, tal fato foi associado a possíveis modificações pós-traducionais (CAUMO *et al.*, 2014).

Por meio da análise proteômica por eletroforese bidimensional e análise da expressão gênica por qPCR das proteínas encontradas, foi demonstrada uma maior expressão de determinados grupos proteicos como proteína chaperona DnaK e proteínas chaperoninas em cistos. Uma proteína hipotética e uma porina eucariótica tiveram sua expressão aumentada nos trofozoítos de *Acanthamoeba*. As porinas estão presentes nas membranas e em várias organelas internas, interagem com outras moléculas desempenhando um importante papel no controle de transporte celular (BEHERA; SATPATHY, 2016).

Proteases secretadas têm sido descritas como um importante fator de virulência em *Acanthamoeba* (LORENZO-MORALES *et al.*, 2006; MATTANA *et al.*, 2002). Com o objetivo de compreender melhor o seu papel na patogênica da acantamebíase, Huang e colaboradores (2016) compararam o perfil dessas proteases em uma cepa patogênica de *Acanthamoeba castellanii* com uma cepa não patogênica. Nesse estudo, 44 proteases secretadas foram identificadas, sendo que 10 foram consenso entre as cepas e 34 foram cepa-específicas. Além destas proteases, algumas quinases que podem estar diretamente envolvidas nas infecções causadas por essas amebas também foram encontradas (HUANG *et al.*, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Acanthamoeba é um organismo de vida livre ubíquo, capaz de, eventualmente, causar graves infecções no ser humano. O aumento do número de casos descritos de infecções como EAG e CA indica que *Acanthamoeba* é um importante patógeno emergente. A CA, uma potencial causa de cegueira, é uma infecção crônica da córnea de difícil tratamento, que pode ser confundida com outras infecções, dificultando o diagnóstico (DART; SAW; KILVINGTON, 2009). Os mecanismos de invasão na ceratite amebiana têm sido estudados, porém há pouca informação sobre moléculas envolvidas neste processo (CLARKE E NIEDERKORN 2006). Os altos títulos de anticorpos específicos contra *Acanthamoeba* encontrados na população demonstram o constante contato dessa ameba de vida livre com os seres humanos (KHAN, 2006). Porém, somente alguns genótipos e espécies foram associados com as infecções causadas por *Acanthamoeba* (BOTTON *et al.*, 2005; KHAN, 2006). Nesse contexto é possível que as linhagens que desenvolvam infecção tenham que passar por um processo adaptativo para a vida parasitária, que deve envolver a expressão de proteínas diferenciais em relação à sua condição em vida livre. Estudos sobre processos biológicos que determinam a transição da vida-livre para a vida parasitária ainda são escassos, e, devido à importância da *Acanthamoeba* como patógeno emergente, o conhecimento dos mecanismos moleculares que regem este processo faz-se necessário. Nossa hipótese é que *Acanthamoeba* pode estar modulando a expressão de proteínas para se adaptar ao processo de invasão e colonização, levando ao desenvolvimento de CA. Sendo assim, nossa proposta é realizar um estudo de proteômica comparativa entre um isolado de *Acanthamoeba*, proveniente de caso humano de CA, mantido em cultura axênica a longo termo e uma cultura de *Acanthamoeba* recém-isolada de modelo experimental de ceratite. Pretende-se identificar proteínas diferencialmente expressas envolvidas no processo patogênico. A identificação destas proteínas contribuirá para o aumento do conhecimento sobre mecanismos de patogenicidade de *Acanthamoeba* e, futuramente, este conhecimento pode ser explorado para na investigação de potenciais alvos diagnósticos ou terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Empregar abordagem proteômica para Identificar proteínas diferencialmente expressas em trofozoítos de um isolado de *Acanthamoeba* pertencentes ao genótipo T4, antes e após a recuperação em modelo animal de ceratite amebiana.

3.2 Objetivos específicos

- Padronização do modelo experimental de ceratite amebiana em ratos Wistar.
- Recuperar trofozoítos de *Acanthamoeba* de genótipo T4 de lesões de córnea, induzidas experimentalmente;
- Comparar o perfil de proteínas expressas em isolados mantidos em cultura axênica com o perfil de proteínas de parasitas recém isolados de hospedeiros;
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas das culturas originais e re-isoladas;
- Analisar as características moleculares e funcionais referentes às proteínas diferencialmente expressas e correlacioná-las com padrões de virulência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo de *Acanthamoeba* spp.

Um isolado de *Acanthamoeba* pertencente ao genótipo T4, o qual é frequentemente encontrado em casos clínicos de ceratite (MACIVER *et al.*, 2013), foi utilizado nesse estudo. O isolado ALX foi obtido de paciente com ceratite amebiana, proveniente da cidade de Vitória, ES. Este isolado apresenta tolerância à temperatura de 42°C, o que representa uma das características observadas em amostras virulentas (DUARTE *et al.*, 2013).

Os parasitos foram cultivados em meio PYG (protease peptona, extrato de levedo e glicose) (ROWBOTHAN, 1980) contendo 10% de soro bovino fetal e antibiótico (Enrofloxacino 2 µg/mL). Os trofozoítos foram mantidos em tubos de vidro (100 x 15mm), com tampa de rosca, contendo 2 mL de meio a temperatura ambiente (TA). Os repiques foram realizados uma vez por semana.

Para obtenção de quantidades maiores de trofozoítos, foram realizados repiques escalonados, em garrafas de cultivo de 25 cm² e depois em garrafas de 75 cm². Conforme trabalhos de Mesquita (2015), entre 48 e 72h de cultivo os trofozoítos atingem seu crescimento exponencial e por isso culturas com esse tempo de crescimento foram usadas nos experimentos.

4.2 Infecção experimental e reisolamento

Três ratos Wistar machos de 45 dias de idade foram utilizados para inoculação intra-estromal de trofozoítos, conforme procedimentos descritos por Ren e Wu (2010). Esses autores observaram 100% de infecção em ratos Wistar dessa mesma idade e com a via intra-estromal de inoculação. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina a 60mg/kg associado com cloridrato de xilazina a 7,5 mg/kg por via intraperitoneal, e com o uso tópico de lidocaína a 2% na superfície ocular. A córnea direita de cada animal foi visualizada em lupa e lavada com solução salina. Foi inoculado 2 µL de suspensão contendo 10⁴ trofozoítos em meio PYG, usando seringa fina de 30 G. Na córnea esquerda foi inoculado 2 µL de PBS 1X esterilizado, como controle. Entre o terceiro e sexto dia, período em que se formam lesões ativas visualmente detectáveis, os animais com lesões foram submetidos à eutanásia com o dobro da dose de anestésicos. Para o reisolamento, as córneas foram removidas em condições assépticas e um fragmento de cerca de 2 mm, retirado com bisturi, foi inoculado em 2 mL de meio PYG com soro bovino fetal contendo antibiótico

(Enrofloxacino 2 µg/mL). Este primeiro re-isolado foi utilizado para infectar oito animais, nas mesmas condições descritas anteriormente. Os procedimentos de infecção experimental foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UFGM protocolo número nº 166 /2014. Desses oito animais inoculados, foi possível recuperar trofozoítos de lesão de córnea de três. Essas culturas foram repicadas por no máximo quatro passagens e congeladas com dimetilsulfoxido (DMSO 10%) em freezer -80° C.

4.3 Extração proteica dos trofozoítos

Para a extração de proteínas totais foram utilizados 10⁸ trofozoítos de *Acanthamoeba*. Foram testados dois métodos de extração proteica: (1) Lise por congelamento e descongelamento associado com uso de detergente zwitterionico e, (2) Lise mediada por sonicação.

No primeiro protocolo, foi realizada a adição direta de tampão de hidratação (uréia [7M], tiouréia [2M], CHAPS 4% e PMSF [10 mM]) na proporção de 1000 µL para 10⁸ trofozoítos. As amostras foram submetidas a 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 30°C. Centrifugação a 100 x g por 1 minuto, foi realizada a fim de remover restos celulares. O sobrenadante foi transferido para tubos novos, dosado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e armazenado a -80°C.

No segundo método, 10⁸ trofozoítos ressuspensos em 1 mL de tampão de lise (tris-HCL [25mM]) foram sonicados no gelo, com cinco ciclos de 30 segundos a 25 hertz, em intervalos de um minuto entre os pulsos. O lisado foi centrifugado a 10000 x g por 15 minutos à 4°C. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas em tricloro acético ácido (TCA) 10% por 2 horas, em seguida foram centrifugadas 1000 x g por 1 minuto. O sedimento foi lavado com acetona gelada, agitado em vórtex por 1 minuto, esse procedimento foi realizado três vezes. Após a secagem, o sedimento foi solubilizado com o auxílio de ponteira e acrescentado 500 µL de tampão de hidratação. Após a hidratação por 16 horas a solução foi dosado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e armazenado a -80°C.

As proteínas totais foram submetidas à separação eletroforética unidimensional em gel de poliacrilamida 12%, a fim de avaliar a qualidade dos extratos obtidos. Uma vez determinado o melhor protocolo de lise para o isolado de longo prazo, denominado ALXltc, o mesmo procedimento foi realizado com as demais amostras, que foram denominadas ALXrec1, ALXrec2 e ALXrec3.

4.4 Eletroforese bidimensional (2DE) em gel de poliacrilamida

Na primeira dimensão foi utilizado 900 µg do extrato de proteínas, que foi diluído em tampão de hidratação (uréia [7M], tiouréia [2M], CHAPS 4%, DTT [65mM], 1,5% tampão IPG pH 4-7) com volume final de 250 µL por *strip*. As amostras foram carregadas em *strips* (*Immobiline DryStrip*) de pH 4-7, 13 cm (GE HealthCare, Reino Unido) e incubadas temperatura ambiente por 18 horas para reidratação passiva, antes de proceder para focalização isoeétrica (IEF). As amostras foram submetidas à IEF no aparelho EttanIPGphor 3 (GE HealthCare, Reino Unido) nas seguintes condições: 1 h 100 V *step* (STP), 1 h 200 V gradiente (GRD), 1h 500 V GRD, 1h 1000 V STP, 1h 2000 V STP, 1h 4000 V STP, 8000 V até acumular 60.000 V. Ao serem retiradas do aparelho, as *strip* foram armazenadas a -80°C.

Na segunda dimensão, as proteínas foram separadas por peso molecular em géis homogêneos de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). As *strips* foram inicialmente equilibradas por 15 minutos, sob agitação lenta e constante, em 10 mL de tampão de equilíbrio I (tris-HCl [1,5 M] pH 8,8; uréia [6 M]; glicerol 99,5%; SDS 2%; traços de azul de bromofenol e DTT [130mM]), e posteriormente por 15 minutos, também sob agitação lenta, em tampão de equilíbrio II (tris-HCL [1,5M] pH8,8; uréia [6M]; glicerol 99,5%; SDS 2%; traços de azul de bromofenol e iodocetamida [135mM]). O padrão de peso molecular utilizado foi *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific, Estados Unidos da América). As *strips* bem como o padrão foram selados com agarose 0,5% em tampão de eletroforese (tris [250 mM]; glicina [1,92 M]; 1% SDS; traços de azul de bromofenol). As corridas foram realizadas em tampão de eletroforese de proteínas (tris-HCl pH 8,3 [250 mM]; 1,92 [M] de glicina e 1% de SDS) e em uma voltagem de 20 mA /gel. Após a corrida os géis foram fixados em solução de etanol 40%, ácido acético 10%, por no mínimo duas horas e então corados com azul de coomassie G-250 coloidal (azul de coomassie G250 5%, ácido ortofosfórico 2% e sulfato de amônio 10%) por 30 horas. Os fundos dos géis foram clareados com metanol 20% e posteriormente digitalizados pelo Scanner ImageScanner III (GE HealthCare, Reino Unido). Os géis escaneados em seguida foram armazenados a 4°C em solução de sulfato de amônio 10% até a realização dos procedimentos de excisão dos *spots* para espectrometria de massa. Os géis 2DE foram produzidos em triplicata para cada uma das quatro amostras (ALXltc, ALX-rec1, ALX-rec2 e ALX-rec3).

4.5 Análise das imagens dos géis bidimensionais

Triplicatas de géis de cada grupo (ALXltc, ALXrec1, ALXrec2 e ALXrec3) foram digitalizadas no densitômetro ImageScanner III, devidamente calibrado com Kodak *tablet n° 3* e analisadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7 (GE HealthCare, Reino Unido). Os parâmetros utilizados para a detecção dos spots foram: área mínima 5 pixels, com fator *smooth* de 2 e saliência de 250. Todos os *spots* detectados pelo *software* foram avaliados manualmente, com objetivo de verificar se correspondiam verdadeiramente a *spots*. As imagens dos géis foram processadas utilizando algoritmos desenvolvidos para detectar, atribuir *pI* e massa molecular, quantificar e identificar os *spots* correspondentes entre as séries de géis (*match*). A reprodutibilidade dos géis foi avaliada por *scatter plots* comparando os géis de cada triplicata técnica, valores de coeficiente de variação próximos de 1 representam uma correlação alta entre os géis. Para a identificação das proteínas diferencialmente expressas entre as amostras, o programa emprega o teste ANOVA no qual os valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos. Os *spots* diferencialmente expressos foram excisados do gel e submetidos à identificação por espectrometria de massas.

4.6 Excisão e digestão triptica dos spots

Os *spots* indicados na análise como proteínas diferencialmente expressas foram selecionados para identificação por espectrometria de massas.

Os *spots* de interesse foram excisados do gel e transferidos para tubos de micro centrífuga, descorados com uma solução de etanol 40% e bicarbonato de amônio [75mM] pH 8,0. Os *spots* foram submetidos a uma série de lavagens nessa solução com 10 minutos de descanso entre as lavagens, até descorarem por completo. Em seguida foram desidratados pela adição de 200 μ L de acetonitrila por 5 minutos. A acetonitrila foi removida e os géis secos em *SpeedVac*. Os *spots* foram tratados com solução de tripsina [20 μ g/mL], em seguida, foi adicionado uma solução de bicarbonato de amônio ([25mM] pH 8,0) e as amostras foram incubadas à 37°C por 16 horas. Após esse tempo, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, uma solução de ácido fórmico 5% e Acetonitrila 50% foi adicionada aos tubos contendo o fragmento de gel e incubados por 30 minutos sob agitação a fim de aumentar a recuperação dos peptídeos tripticos. Este procedimento foi realizado mais duas vezes e os sobrenadantes foram transferidos para o mesmo tubo. As amostras foram totalmente secas em *SpeedVac* e enviadas para análise por espectrometria de

massas no Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

4.7 Espectrometria de massas

Os peptídeos foram carregados em uma coluna C18 (Supelco, 2,1 x 50 mm, 100Å), acoplado a um sistema Shimadzu ESI-IT-TOF LC-MSn (Shimadzu Co., Japão). Foi utilizado um gradiente linear de 0 a 40% de solvente B1 (A1: 0,1% de AA; B1: 90% de ACN contendo 0,1% de AA) para eluir os peptídeos. Os principais parâmetros do instrumento foram tensão de interface de 4,5 kV, tensão do detector de 1,76 kV e temperatura capilar de 200°C, em um modo de ionização positiva, e varredura completa (50 a 2000 m/z) seguido de aquisição dependente de dados (DDA) MS2, um intervalo de 100-2000 m/z obtido após a fragmentação do CID (Ar). A aquisição e processamento de dados foram realizados pelo software suíte do LCMS solutions (Shimadzu Co, Japão).

Para a identificação de proteínas, os espectros processados foram analisados pelo MASCOT (Matrix Science Inc), usando o modo MS/MS *ion search*, com tolerância de 0,5 Da para MS e MS/MS e verificados manualmente para verificar a precisão e correção. Os bancos de dados completos do subconjunto NCBI nr e *Acanthamoeba* foram selecionados para pesquisa.

4.8 Construção dos gráficos

Para a construção dos gráficos de análises de função molecular e processos biológicos (*Gene ontology*) das proteínas identificadas e selecionadas como diferencialmente expressas foi utilizado o programa GraphPadPrism7.03. O *heatmap* foi construído no software R (R x 64 3.1.3) a partir de uma matriz de dados em extensão CSV, contendo o nome das proteínas identificadas e os valores de *Fold Change* em log na base 2. Os valores de *foldchange* entre ALXltc e ALXrec1, ALXrec2 e ALXrec3 foram calculados a partir dos dados de densitometria de cada *spot* normalizados pelo *background* de coloração do gel (porcentagem de volume). Os valores de *foldchange* foram normalizados em logaritmo de base 2 (\log_2), o pacote utilizado foi o *gplot* com o *script heatmap.2*. A análise de agrupamento hierárquico (HCA) foi feita utilizando os valores dos \log_2 dos valores *fold change* para a associação entre as proteínas e apresentada na forma de um dendograma no *heatmap* (GREGORY *et al.*, 2015).

5 RESULTADOS

5.1 Infecção experimental e reisolamento

Para a comparação de proteínas expressas por trofozoítos de *Acanthamoeba* em uma cultura axenizada de longo prazo e trofozoítos recuperados de lesões de córnea, realizou-se a infecção em oito ratos Wistar com objetivo de gerar um modelo animal de ceratite amebiana e recuperar os protozoários para a análise.

Dos oito animais inoculados com trofozoítos de *Acanthamoeba*, que já haviam sido recuperados de uma passagem em córnea de ratos, quatro apresentaram lesões aparentes (**Figura 8 A, B, C e D**). As córneas inoculadas com PBS (controle) não apresentaram lesões (**Figura 9 E**).

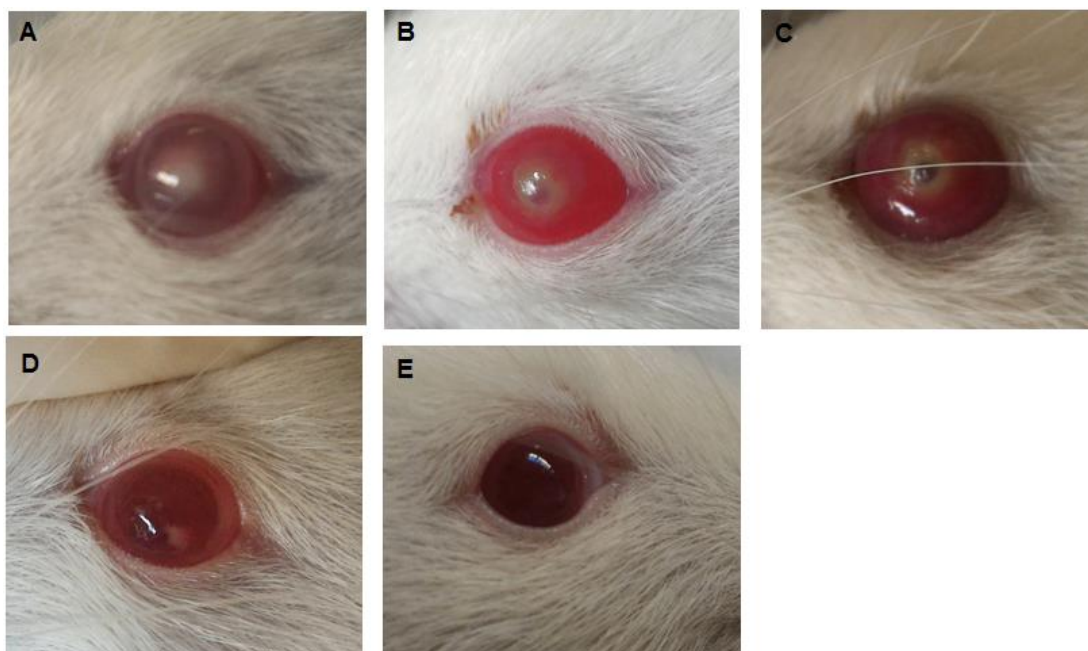


Figura 8: Córnea dos animais utilizados para infecção por *Acanthamoeba*. A) Córnea apresentando opacidade e infiltrado inflamatório em forma de anel. B-C) Córneas com hiperemia e infiltrado inflamatório. D) Córnea com mancha branca compatível com o início da formação de infiltrado inflamatório. E) Córnea controle, sem lesão aparente.

O material da biópsia foi dividido, sendo uma parte semeada em ágar não nutriente para fins de diagnóstico e a outra inoculada em meio PYG para recuperação dos parasitos e todos resultaram em crescimento positivo para o teste de cultivo em ágar não nutriente, ao contrário dos controles, que resultaram em diagnósticos negativos. Três das amostras recuperadas em meio PYG apresentaram crescimento exuberante de trofozoítos após 72 horas, a quarta amostra apresentou contaminação bacteriana e foi descartada.

5.2 Padronização do método de extração proteica de trofozoítos

Para definir qual método de obtenção de proteínas mais adequado para procedermos com a análise proteômica testamos o protocolo de extração proteica por sonicação e “freeze/thaw” na presença de detergente CHAPS.

5.2.1 Comparação dos extratos proteicos por SDS-PAGE

O rendimento obtido pelo protocolo *freeze-thaw* (11,96 mg/mL) foi maior do que o protocolo de lise por sonicação (4 mg/mL). No entanto, após análises por SDS-PAGE, observou-se que o extrato obtido por sonicação foi de melhor qualidade. Foram observadas bandas bem definidas de alto, médio e baixo peso molecular nas amostras obtidas por ambas as técnicas. Entretanto, as bandas referentes ao método de lise por sonicação estão em maior número e com melhor resolução (**Figura 9**).

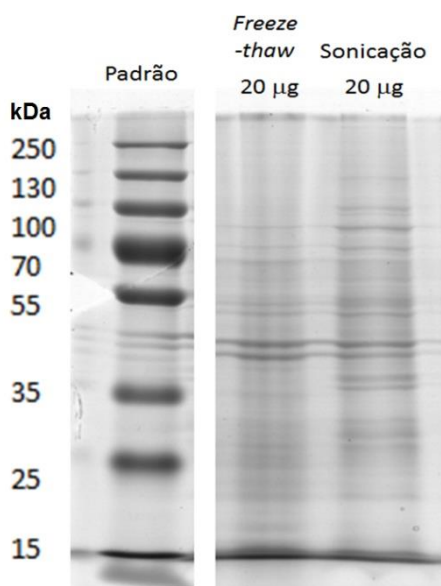


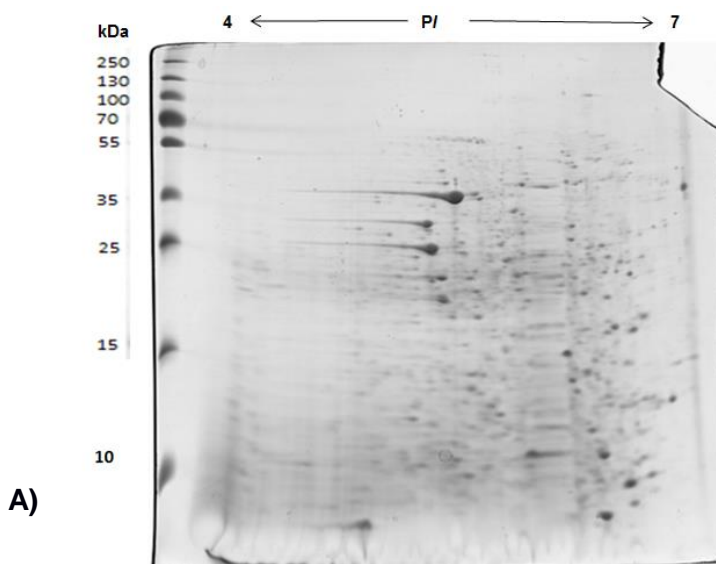
Figura 9: Gel unidimensional SDS-PAGE dos extratos proteicos dos trofozoítos de *Acanthamoeba* da cepa ALX de longo prazo. 10^8 trofozoítos foram processados por *freeze-thaw* e por sonicação e 20 µg de proteína total de cada amostra foi aplicada nas canaletas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. O padrão de peso molecular utilizado foi PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). O gel foi corado por azul de coomassie.

5.2.2 Eletroforese Bidimensional (2DE)

Após a avaliação por SDS-PAGE os extratos foram avaliados por eletroforese bidimensional utilizando *strips* 13 cm, pH 4-7. A especificação da *strip* foi determinada

com base nos dados apresentados por Caumo e colaboradores (2014) onde observa-se que não há quantidade significativa de *spots* nas faixas de pH 3-4, 8-10. Referente ao protocolo de lise utilizando o método de *freeze-thaw*, foi possível observar proteínas bem focalizadas entre pH 6-7 (**Figura 10 A**). Entre os p/Is 4-5 não houve focalização isoeletrica. Proteínas de alto e baixo peso molecular foram observadas. Houve predominância de *spots* entre 70 kDa e 15 kDa. Mesmo a técnica apresentando boa resolução dos *spots* houve arrastes na extremidade mais básica da *strip*.

Quando utilizado o método de sonicação, foi possível observar proteínas ao longo de toda faixa de pH determinada (**Figura 10 B**) também foi observada uma ampla distribuição de proteínas de alto médio e baixo peso molecular na segunda dimensão. Houve predominância de *spots* entre 100 kDa e 25 kDa com os mais intensos entre 70 kDa e 25 kDa. A resolução de *spots* nesse gel foi melhor que a do gel de proteínas extraídas por *freeze-thaw*. No entanto a quantidade de *spots* observados foi menor entre 35 e 15 kDa. Uma quantidade menor de arrastes foi observada em relação ao gel de proteínas extraídas por *freeze-thaw*. Com base nessas observações foi determinado que o método de sonicação forneceu extratos proteicos de melhor qualidade, sendo assim definido como método de extração para os experimentos posteriores.



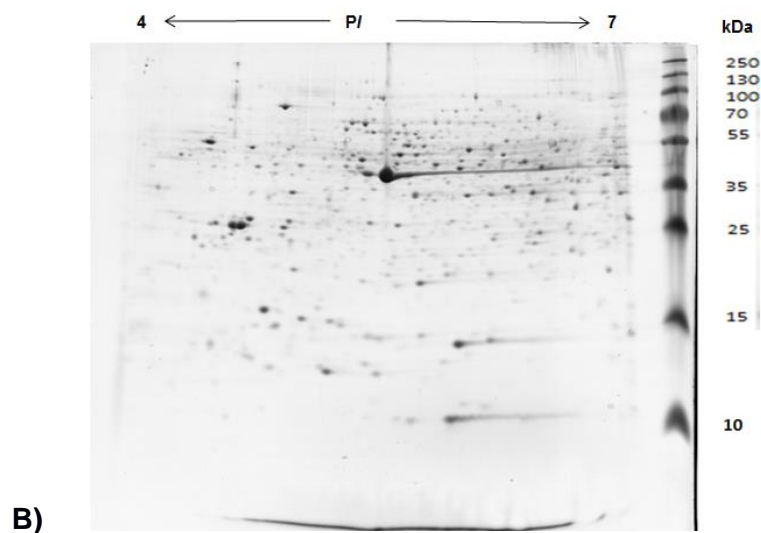


Figura 10: Géis bidimensional em gradiente de pH 4-7 das proteínas totais da cultura de longo prazo ALX (ALXltc). A) Eletroforese do extrato proteico obtido pelo protocolo de lise por freeze-thaw. B) Eletroforese do extrato proteico obtido pelo protocolo de lise por sonicação. Para a focalização isoeletrica, 600 µg de proteínas totais de trofozoítos de *Acanthamoeba* da cepa ALXltc de ambas as técnicas foram aplicadas nas *strips* de gel com gradiente de pH 4-7. Posteriormente as proteínas já focalizadas foram separadas na segunda dimensão em eletroforese de poliacrilamida de 15%. O padrão de peso molecular utilizado foi PageRuler Plus Prestained Protein Ladder da marca Thermo Scientific. O gel foi corado pelo azul de comassie coloidal G-250.

5.3 Proteômica comparativa entre trofozoítos da cultura axênica de longo prazo (ALXltc) e recém recuperados de lesões de córnea.

5.3.1 Gel unidimensional SDS-PAGE

Após a lise das proteínas da cultura em longo prazo ALXltc e dos recuperados ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3 pelo método de sonicação realizou-se uma eletroforese unidimensional para avaliar a qualidade dos extratos proteicos obtidos. Tanto na amostra em cultivo de longo prazo como nas replicatas recuperadas de lesão de córnea, foi observada a presença de bandas bem definidas de alto, médio e baixo peso molecular, com alta reprodutibilidade nas amostras recuperadas (**Figura 11**).

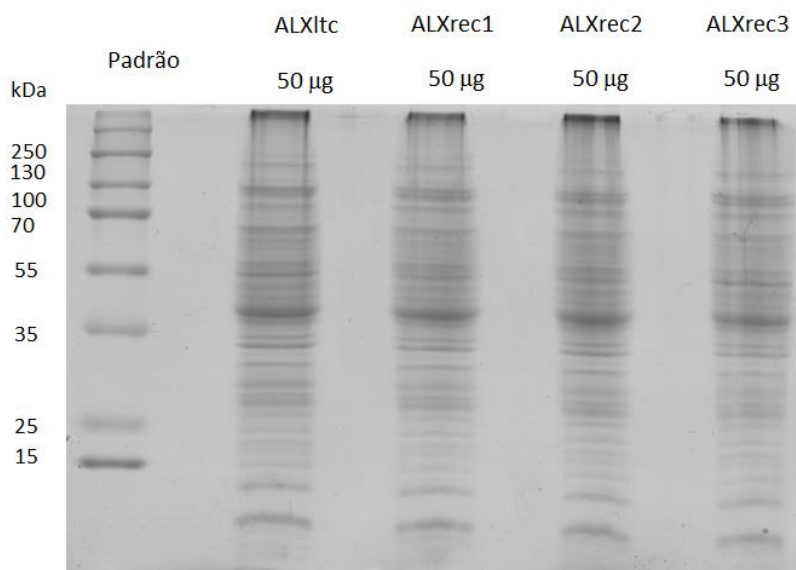


Figura 11: Gel unidimensional SDS-PAGE dos extratos proteicos dos trofozoítos de *Acanthamoeba* da cepa ALXltc e dos recuperados ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3. Cerca de 10^8 trofozoítos foram processados por sonicação e cada amostra foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e corado por azul de coomassie coloidal. 50 µg de extrato de proteína total de cada amostra foi aplicada nas canaletas. O padrão de peso molecular utilizado foi PageRuler Plus Prestained Protein Ladder da marca Thermo Scientific

5.3.2 Análise das imagens dos géis bidimensionais

Para cada amostra foi gerada uma triplicata técnica (**Anexo 1**) a fim de realizar os testes estatísticos para determinação das proteínas diferencialmente expressas entre os isolados. O perfil de proteínas das amostras de cultivo em longo prazo (ALXltc) e recuperadas de lesão de córnea (ALXrec1, ALXrec e ALXrec3), apresentado nos géis bidimensionais da ALXltc, ALXrec1, ALXrec e ALXrec3, é demonstrado na **Figura 12 de A a D** . Houve predominância dos *spots* localizados nos gradientes de pH de 6-7, com massas entre 100 kDa e 15 kDa, em todas as triplicatas técnicas. Poucas proteínas com o pl entre os gradientes de pH 4-5 com as massas moleculares entre 250 kDa e 35 kDa foram focalizadas.

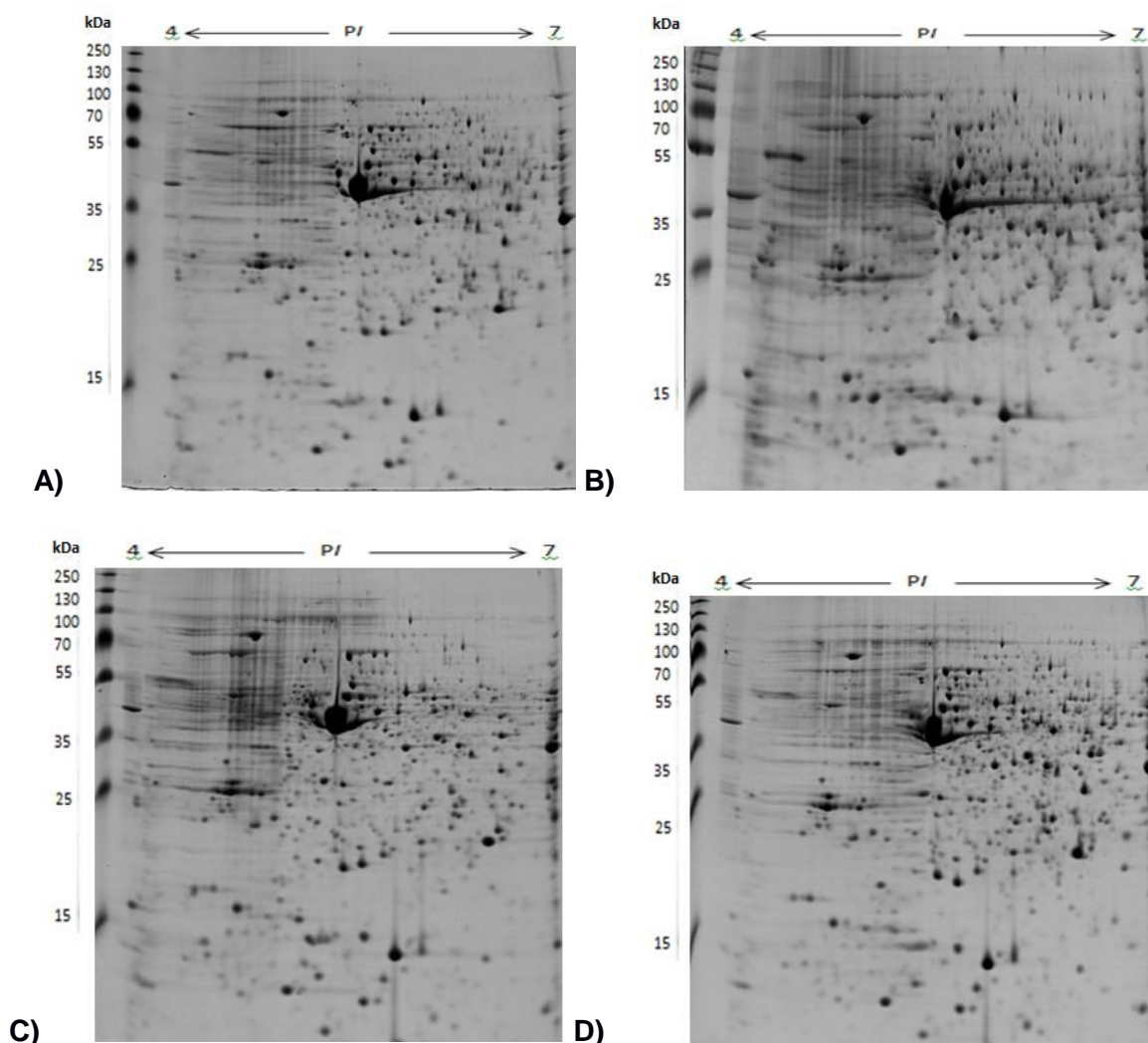


Figura 12: Géis representativos bidimensionais em *strips* de 13 cm gradiente de pH 4-7 das proteínas totais das triplicatas técnicas da (A) cultura de longo prazo ALXltc, (B) ALXrec1, (C) ALXrec2, (D), ALXrec3. Para a focalização isoelétrica, 900 µg de proteínas totais de trofozoítos de *Acanthamoeba* de cada cepa foram aplicadas nas *strips* de gel de 13 cm com gradiente de pH 4-7. Posteriormente as proteínas já focalizadas foram separadas na segunda dimensão em eletroforese de poliacrilamida de 15%. O padrão de peso molecular utilizado foi PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). O gel foi corado pelo azul de comassie coloidal G-250.

Para avaliar a reprodutibilidade dos géis gerados, os *spots* presentes em cada triplicata técnica foram analisados por método de sobreposição (*matching*). Foi observada uma alta porcentagem de *match* (tabela 1) entre os géis de todas as amostras, conforme visualizado pelas marcações em verde na **figura 13 A, B, C, D**. Os *spots* marcados em vermelho representam os que não tiveram correspondência entre os géis. Os valores dos coeficientes de variação para ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALX3 estão representados na **figura 14 A e B, C e D, E e F, G e H**, respectivamente.

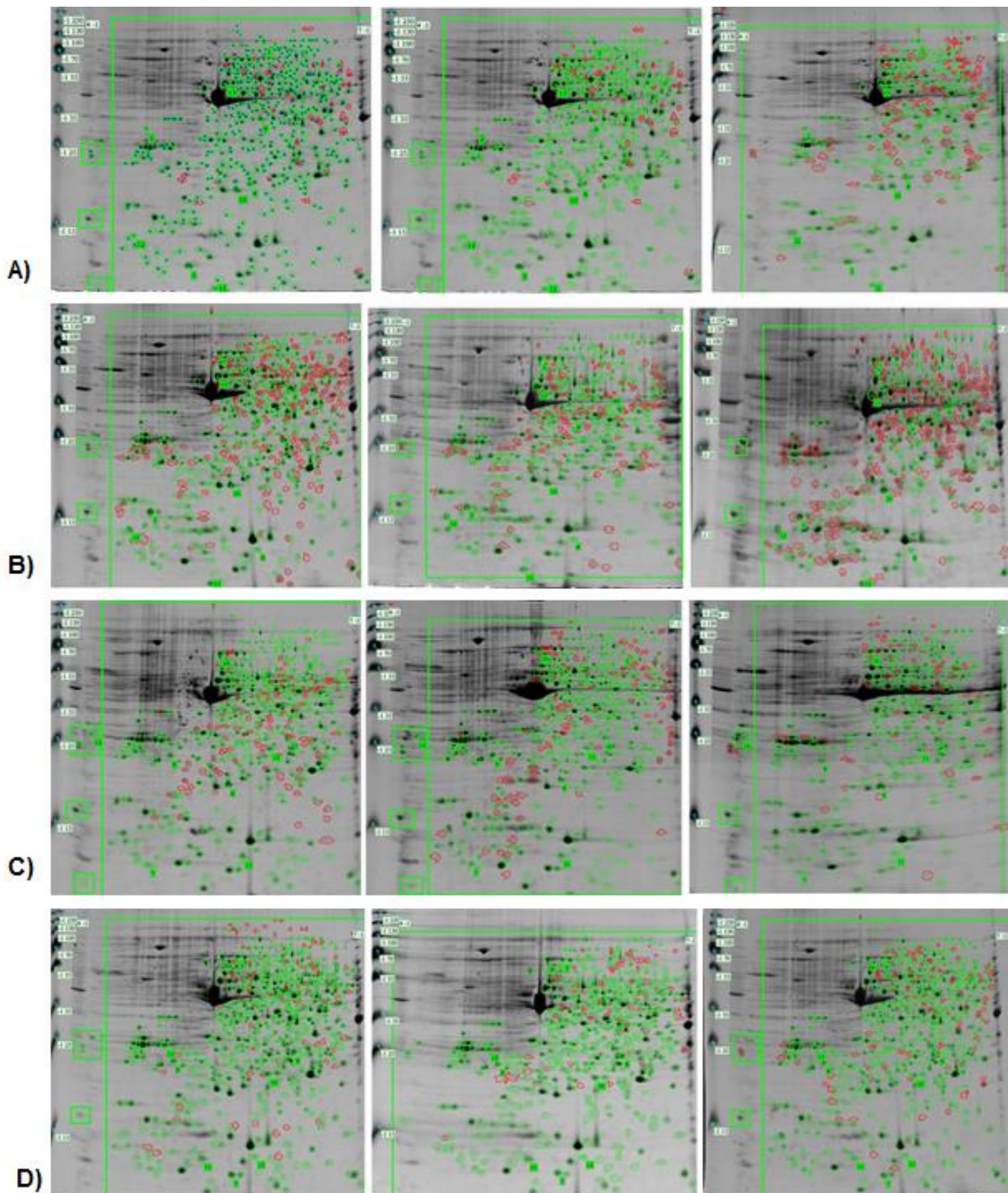
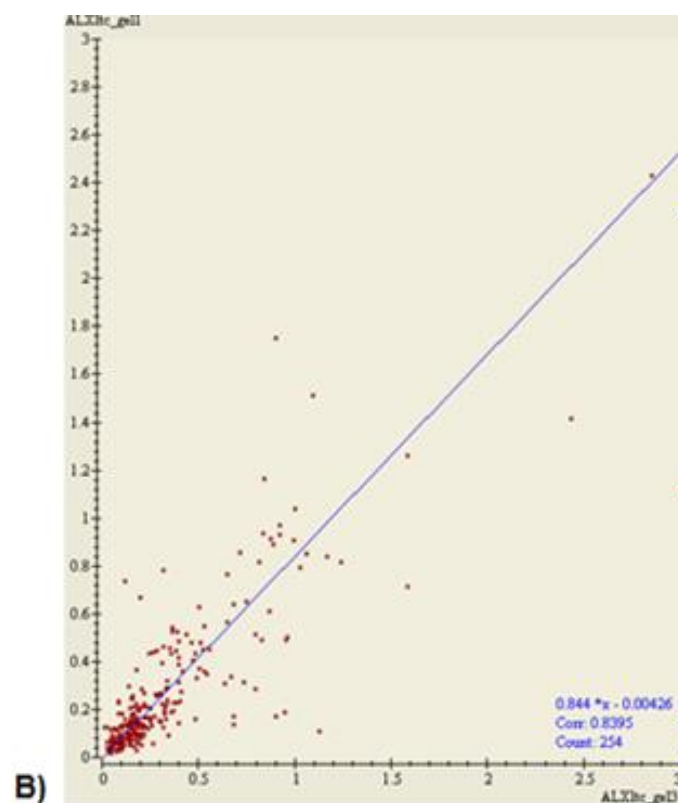
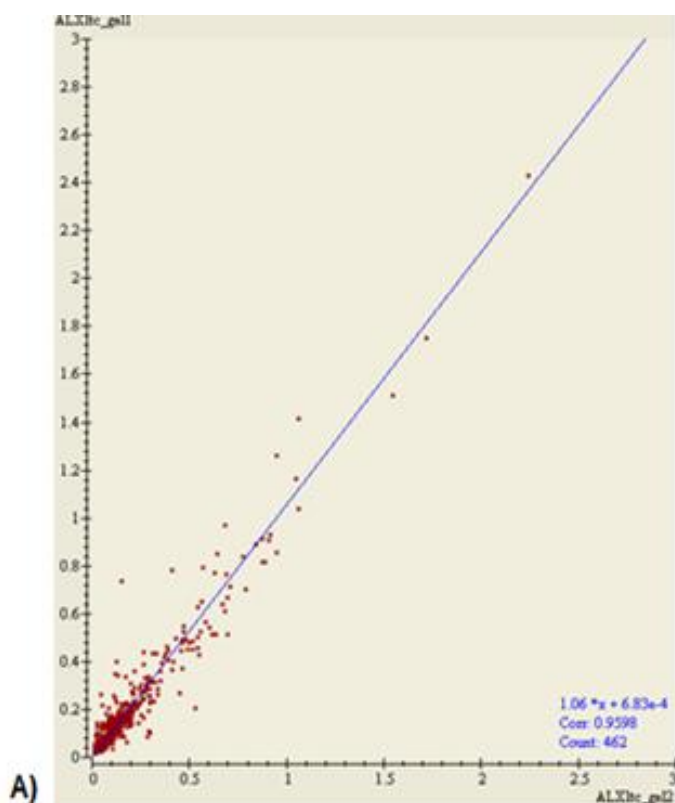
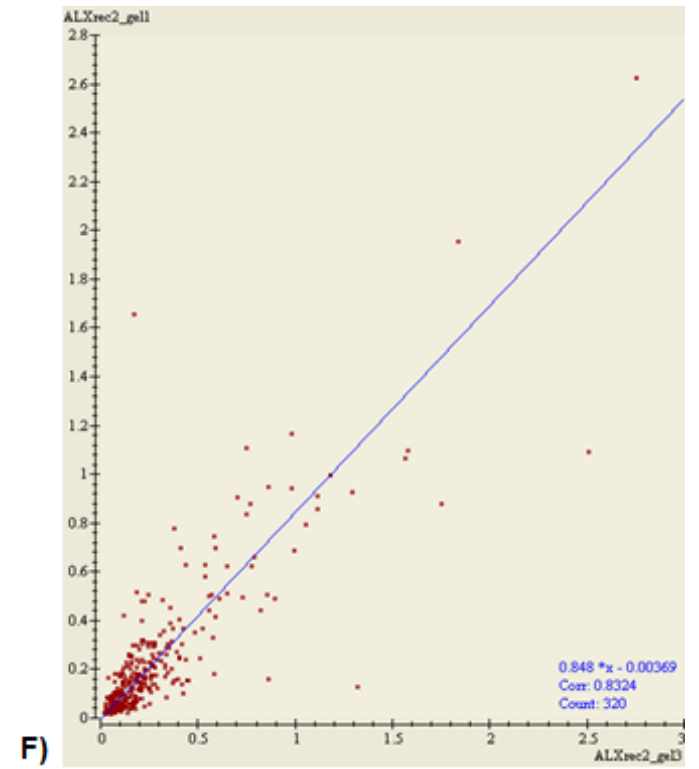
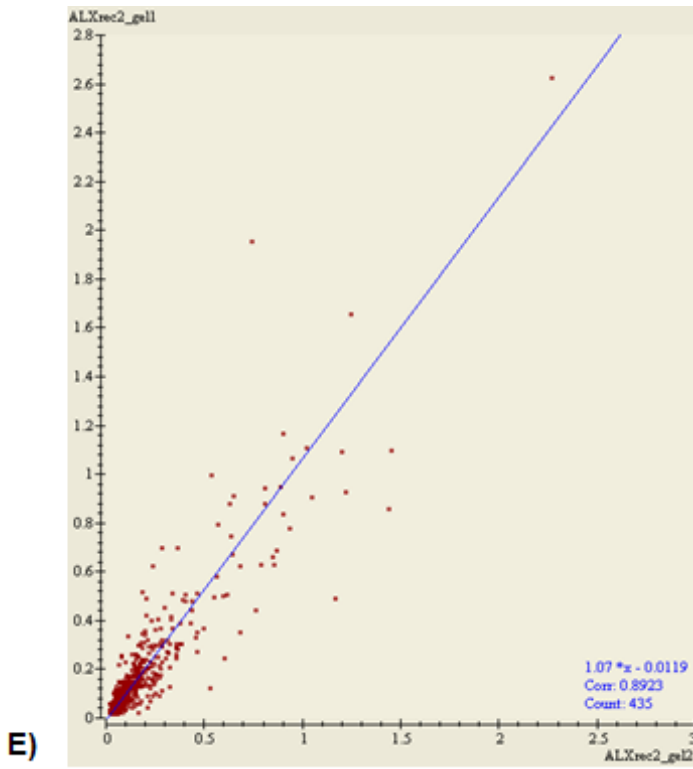
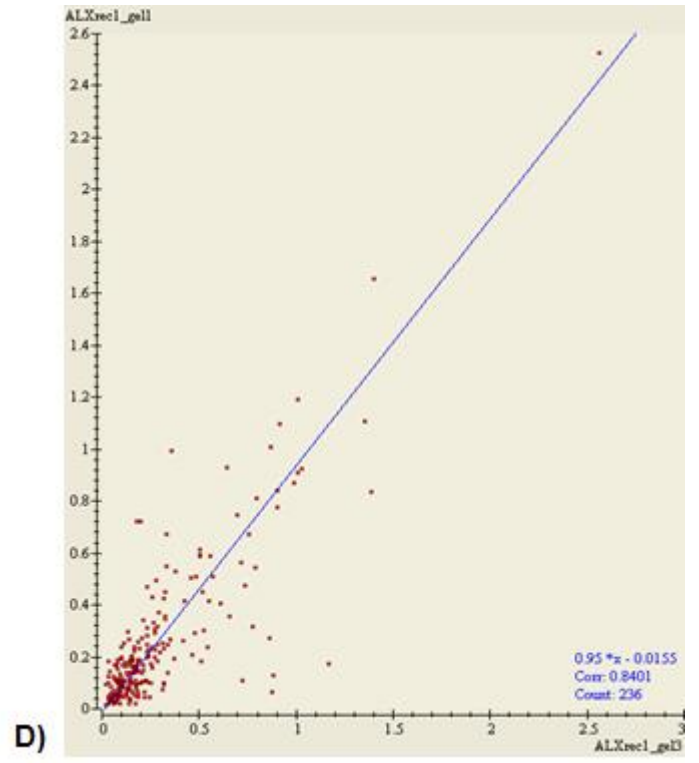
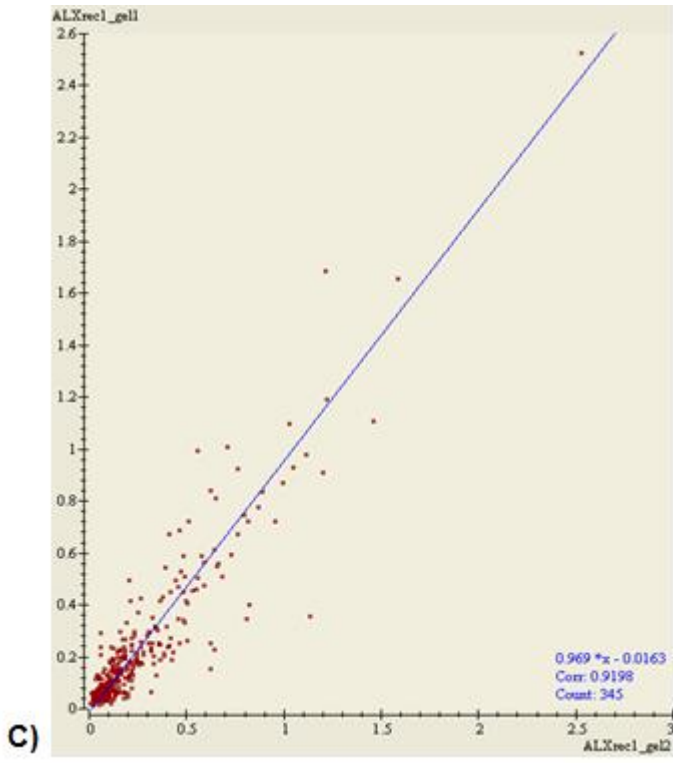


Figura 13: Pareamento (*match*) dos *spots* das triplicatas técnicas de cada amostra. (A) Cultura de longo prazo ALXltc, (B) ALXrec1, (C) ALXrec2, (D) ALXrec3. As marcações em verde são referentes aos spots que tiveram correspondência entre os géis. As marcações em vermelho correspondem aos não pareados.

Tabela 1: Porcentagem dos spots correspondentes na triplicata técnica da cultura de longo prazo ALXltc e das culturas recuperadas ALXrec1, ALXrec2 e ALXrec3.

Amostra	Gel	Spots	Quantidade de <i>match</i> por gel	Porcentagem de <i>match</i>
ALXltc	1	530	473	89%
	2	652	462	71%
	3	378	254	67%
ALXrec1	1	655	417	64%
	2	501	345	69%
	3	473	236	50%
ALXrec2	1	587	321	84%
	2	559	473	81%
	3	382	436	78%
ALXrec3	1	670	583	87%
	2	556	488	88%
	3	627	524	84%





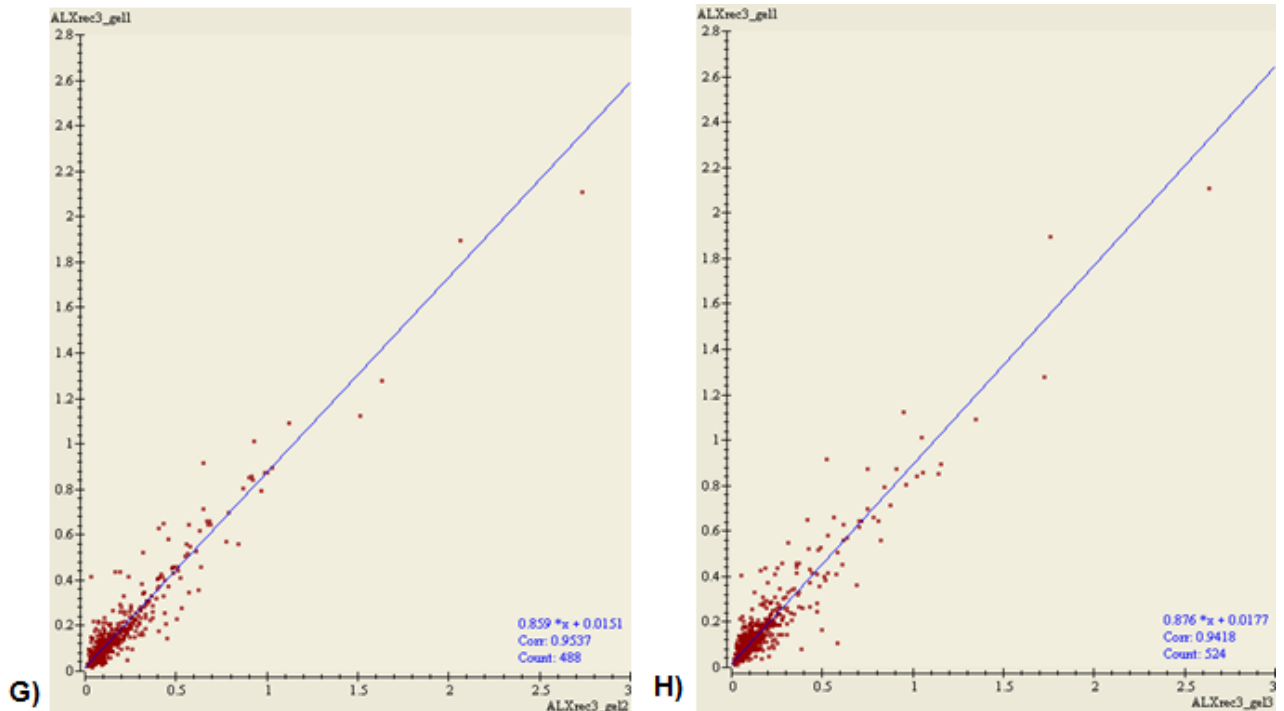
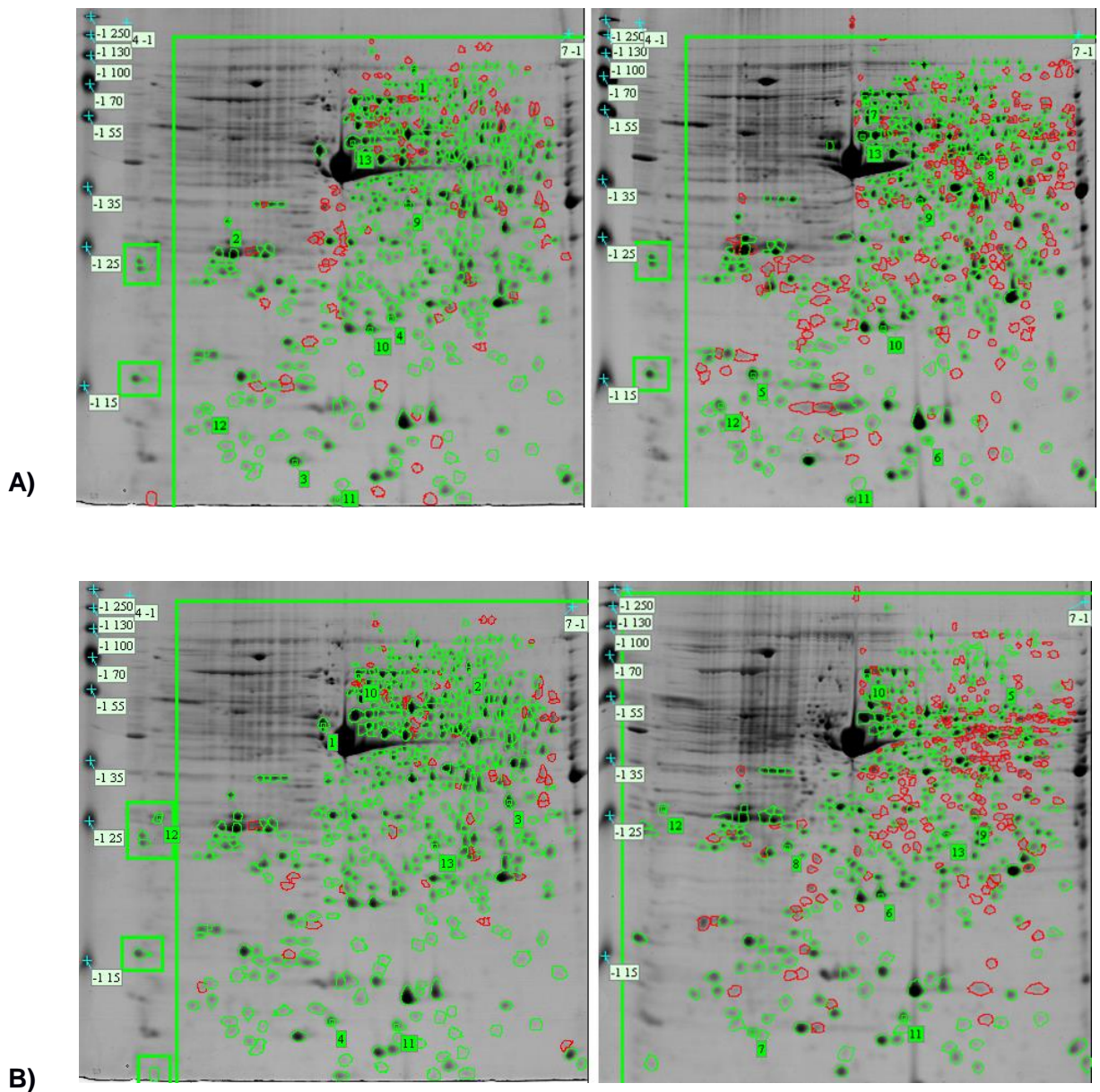


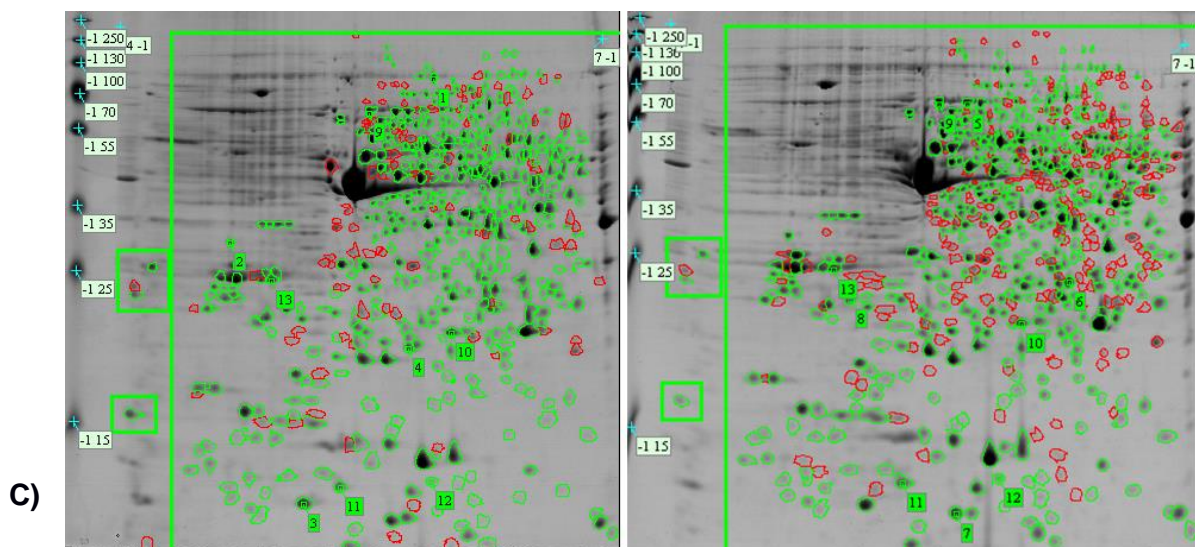
Figura 14: Scatter plots dos géis bidimensionais das triplicatas técnicas de cada amostra. (A-B) Relação entre os valores dos *spots* da comparação do gel referência ALXltc_gel1 com o gel ALXltc_gel2 e de ALXltc_gel1 com ALXltc_gel3. A) Linha de maior ajuste $1,06 \cdot x + 8,83 \cdot 10^{-4}$ e coeficiente de variação corr: 0,96. B) Linha de maior ajuste $0,844 \cdot x + 0,00426$ e coeficiente de variação corr: 0,84. (C-D) Relação entre os valores dos *spots* da comparação do gel referência ALXrec1_gel1 com o gel ALXrec1_gel2 e de ALXrec1_gel1 com ALXrec1_gel3. C) Linha de maior ajuste $0,969 \cdot x + 0,0163$ e coeficiente de variação corr: 0,92. D) Linha de maior ajuste $0,95 \cdot x + 0,0155$ e coeficiente de variação corr: 0,84. (E-F) Relação entre os valores dos *spots* da comparação do gel referência ALXrec2_gel1 com o gel ALXrec2_gel2 e de ALXrec2_gel1 com ALXrec2_gel3. E) Linha de maior ajuste $1,07 \cdot x + 0,0119$ e coeficiente de variação corr: 0,89. F) Linha de maior ajuste $0,848 \cdot x + 0,00369$ e coeficiente de variação corr: 0,83. (G-H) Relação entre os valores dos *spots* da comparação do gel referência ALXrec3_gel1 com o gel ALXrec3_gel2 e de ALXrec3_gel1 com ALXrec3_gel3. G) Linha de maior ajuste $0,559 \cdot x + 0,0151$ e coeficiente de variação corr: 0,95. H) Linha de maior ajuste $0,876 \cdot x + 0,0177$ e coeficiente de variação corr: 0,94.

5.3.2 Análise comparativa

Após a geração de géis representativos para cada triplicata técnica os géis foram sobrepostos (*matching*) para determinar as proteínas diferencialmente expressas entre as culturas ALXltc e ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3. Foram considerados diferencialmente expressos os *spots* que apresentaram o valor do teste estatístico ANOVA com o valor de $p < 0,05$. Foram selecionados somente aqueles *spots* presentes em pelo menos dois dos géis de cada triplicata técnica e que possuíam boa resolução. Os *spots* com correspondência nas amostras ALXltc e ALXrec1, ALXltc e ALXrec2 e ALXltc e ALXrec3 são visualizados pelas marcações em verde na **figura 15 A, B e C**, respectivamente.

Um total de 62 *spots* foram selecionados para a espectrometria de massas, 42 foram identificados na base de dados específica de *Acanthamoeba* (**Anexo 2 e 3**). 25 proteínas foram identificadas como diferencialmente expressas entre a comparação da cultura de longo prazo e amostras recuperadas (**tabela 2**). Na comparação entre as culturas recuperadas 12 proteínas apresentaram diferença estatística (**tabela 3**). Vinte não foram identificados na base de dados de *Acanthamoeba* e serão analisados posteriormente. Cinco proteínas são exclusivas das culturas recuperadas, não sendo detectadas nos géis de ALXltc. Três delas são encontradas em todas as culturas recuperadas, uma somente na ALXrec3 e outra em ALXrec1 e ALXrec3 (**tabela 4**).





C)

Figura 15: Pareamento (*match*) dos spots dos géis representativos da cultura de longo prazo ALXltc a esquerda e das culturas recuperadas (A) ALXrec1, (B) ALXrec2 e (C) ALXrec3. As marcações em verde são referentes aos spots que tiveram correspondência entre os géis. As marcações em vermelho correspondem aos não pareados.

Tabela 2: Spots indicados nos géis bidimensionais como diferencialmente expressos entre ALXItc e ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3.

<i>Spot</i>	Proteína	Número de acesso	PI exp.	PI teo.	MM exp.	MM teo.	<i>Score</i>	Anova (p-valor)
309	Inositol 3-fosfato sintase	ACA1_058810	3,91	5,26	54,83	57,80	223	0,0293
336	Proteína contendo domínio de ligação à FAD	ACA1_080550	6,28	5,97	62	66,4	145	0,0377
444	Sacaropina desidrogenase	ACA1_310610	6,14	6,15	46,67	50,53	210	0,0136
547	S-adenosilmetionina sintase	ACA1_091670	6,37	6,37	40,67	42,85	416	0,0074
624	Desidrogenase acilCoA específica de cadeia curta/ ramificada, mitocondrial, putativa	ACA1_384630	5,83	7,67	37	45,6	206	0,0378
648	Oxidoreductase da família de desidrogenases de ligação ao zinco	ACA1_314990	4,12	6,16	35	38,50	95	0,0268
650	Oxidoreductase da família de desidrogenases de ligação ao zinco	ACA1_314990	5,85	6,16	34,83	38,50	99	0,0028
678	Proteína RAD51, reparo do DNA, putativa	ACA1_201650	3,71	5,51	34,6	37,51	182	0,0498
722	Complexo regulatório 26S proteassomo subunidade RPN11, putativa	ACA1_073080	4,71	6,24	32,5	35,03	61	0,0120

824	S-formilglutamina hidrolase	ACA1_264380	5,54	6,56	24,67	31,51	102	0,0330
847	Proteína contendo domínio universal de estresse	ACA1_368860	6,00	6,57	23	26,64	138	0,0025
861	Ubiquitina carboxi-terminal hidrolase	ACA1_378160	3,04	4,38	23,2	26,78	53	0,0441
910	Proteína hipotética	ACA1_245960	5,80	10,18	21,3	14,65	32	0,0539
941	Rho guanina fator de dissociação isoforma 2, putativa	ACA1_174240	5,17	6,06	19,5	22,87	180	0,0535
972	Tiamina fosfato pirofosforilase	ACA1_061790	4,32	6,93	16,2	48,71	34	0,028
982	Proteína epitioespecificadora (fragmento)	ACA1_198360	5,62	6,4	30,83	37,51	83	0,0037
997	Superóxido dismutase [Cu-Zn]	ACA1_048530	5,70	6,76	14,50	16,48	396	0,0191
1021	Proteína de ligação à Actina	ACA1_035360	4,93	7,72	12,5	14,46	88	0,0504
1026	Subunidade de proteína beta de ligação a nucleotídeos guanina, putativa	ACA1_199990	6,60	6,48	28,83	35,54	611	0,00004
1197	Desoxirribose fosfato aldolase	ACA1_296270	6,32	4,8	19,2	43,17	51	0,03357
1274	Isochorismatase hidrolase	ACA1_384860	5,39	5,27	19,33	20	118	0,0340
1315	Fator de iniciação eucariótica 5A	ACA1_023810	4,11	4,84	15,83	16,80	87	0,0069

1318	Desoxirribose fosfato aldolase	ACA1_296270	4,93	4,8	16,17	43,17	35	0,0316
1384	Desoxirribose fosfato aldolase	ACA1_296270	4,13	4,8	11,5	43,17	47	0,0035
1401	Proteína contendo repetição de anquirina	ACA1_391670	5,45	5,61	10,17	13,23	256	0,0040

PI exp = Ponto isoelétrico experimental

PI teo = Ponto isoelétrico teórico

MM exp = Massa molecular experimental

MM teo = Massa molecular teórica

Tabela 3: Spots indicados nos géis bidimensionais como diferencialmente expressos entre ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3.

Identificação	Gene	PI exp	PI teo	MM exp	MM teo	Score	Anova (p valor)
Serina 3-desidrogenase	ACA1_276080	6,79472	6,67	24,5	22,076	35	0,024
3hidroxibutirato desidrogenase	ACA1_064580	6,52428	6,73	23,6	31,353	87	0,147
Proteína do tipo Tola	ACA1_224400	4,42788	7,1	26,2	33,202	261	0,008
Proteína contando domínio CBS	ACA1_325450	6,53169	6,67	30	35,218	356	0,0000007
BadF/BadG/BcrA/BcrD ATPase proteína de superfamília	ACA1_154210	5,58709	8,42	27	38,682	66	0,015
Proteína hipotética	ACA1_069360	4,31576	4,46	15,4	18,965	191	0,017
Proteína contendo domínio universal de estresse	ACA1_368860	6,1124	6,57	22	26,64	175	0,020

Proteína hipotética	ACA1_180600	4,16921	4,5	12	14,420	65	0,028
Proteína hipotética (fragmento)	ACA1_125390	4,7444	6,8	14,50	18,02	666	0,038
Proteína hipotética	ACA1_378250	6,70285	9,31	24	30,74	170	0,040
Proteína hipotética	ACA1_208120	4,24345	5,24	28,4	36,06	230	0,040
Alfa galactosidase	ACA1_131240	5,28037	6,23	46,57	42,48	119	0,048

Tabela 4: Spots indicados nos géis bidimensionais como exclusivamente expressos.

<i>Spot</i>	Proteína	Número de acesso	PI exp.	PI teo.	MM exp.	MM teo.	Score	Anova (p valor)	Amostra
786	Proteína de superfamília Serpina (inibidor de serino proteinase)	ACA1_382620	6,22	6,19	36	40,24	44	0,0010	r1,r3
923	Carboxipeptidase A1, putativa	ACA1_399750	5,95	6,01	30	47,68	73	0,00001	r1,r2,r3
1219	Proteína hipotética	ACA1_097160	5,55	5,19	17,70	19,37	47	0,000008	r1,r2,r3
1375	Proteína contendo domínio de calponina	ACA1_109720	3,93	6,93	11,86	48,94	97	0,0496	r1,r2,r3
2102	Oxidoreductase, aldo/keto reductase, putativa	ACA1_050180	4,31	6,05	25	34,38	72	0,0010	r3

r1, r2,r3 = culturas recuperadas ALXrec1, ALXrec2, Alxrec3

As proteínas presentes em ALXltc e nas culturas recuperadas foram avaliadas quanto ao seu padrão de expressão em porcentagem de volume dos spots. O *fold change* foi calculado em logaritmo (\log_2), tendo como base a porcentagem de volume dos spots dos parasitos re-isolados em comparação aos ALXltc (Alxre1/ALXltc; ALXrec2/ALXltc; ALXrec3/ALXltc) e representados em um *heatmap*. Os dados foram normalizados em cada coluna, em z-score (escores Z são uma maneira de comparar os resultados de um determinado teste com uma população de distribuição normal). O *heatmap* gerou uma análise de clusterização hierárquica (HCA), separando as proteínas em três grandes grupos, onde 8 proteínas (proteína contendo repetição de anquirina, desoxirribose fosfato aldolase 1, desoxirribose fosfato aldolase 2, desoxirribose fosfato aldolase 3, fator de iniciação eucariótica 5A, isochorismatase hidrolase, superóxido dismutase [Cu-Zn] e ubiquitina carboxi-terminal hidrolase), apresentaram regulação positiva (*fold change* entre 0 e 3); 6 proteínas (complexo regulatório 26S proteassomo subunidade RPN11, putativa, proteína RAD51, reparo do DNA, putativa, proteína contendo domínio de ligação à FAD, S-formilglutamina hidrolase, proteína hipotética, proteína de ligação à actina) com regulação negativa (*fold change* entre 0 e -3) e 10 proteínas (proteína epitioespecificadora (fragmento), subunidade de proteína beta de ligação a nucleotídeos guanina, putativa, inositol 3-fosfato sintase, rho guanina fator de dissociação isoforma 2, putativa, sacaropina desidrogenase, s-adenosilmetionina sintase, desidrogenase acilCoA específica de cadeia curta/ramificada, mitocondrial, putativa, proteína contendo domínio universal de estresse, oxidoreductase da família de desidrogenases de ligação ao zinco 1, oxidoreductase da família de desidrogenases de ligação ao zinco 2) apresentaram sua regulação um pouco mais discreta em comparação com os outros grupos (*fold change* entre -1 e 1). A proteína tiamina fosfato pirofosforilase apresentou uma regulação particular e foi separada dos outros três grupos (*fold change* entre -1,8 e 1,8) (**Figura 17**).

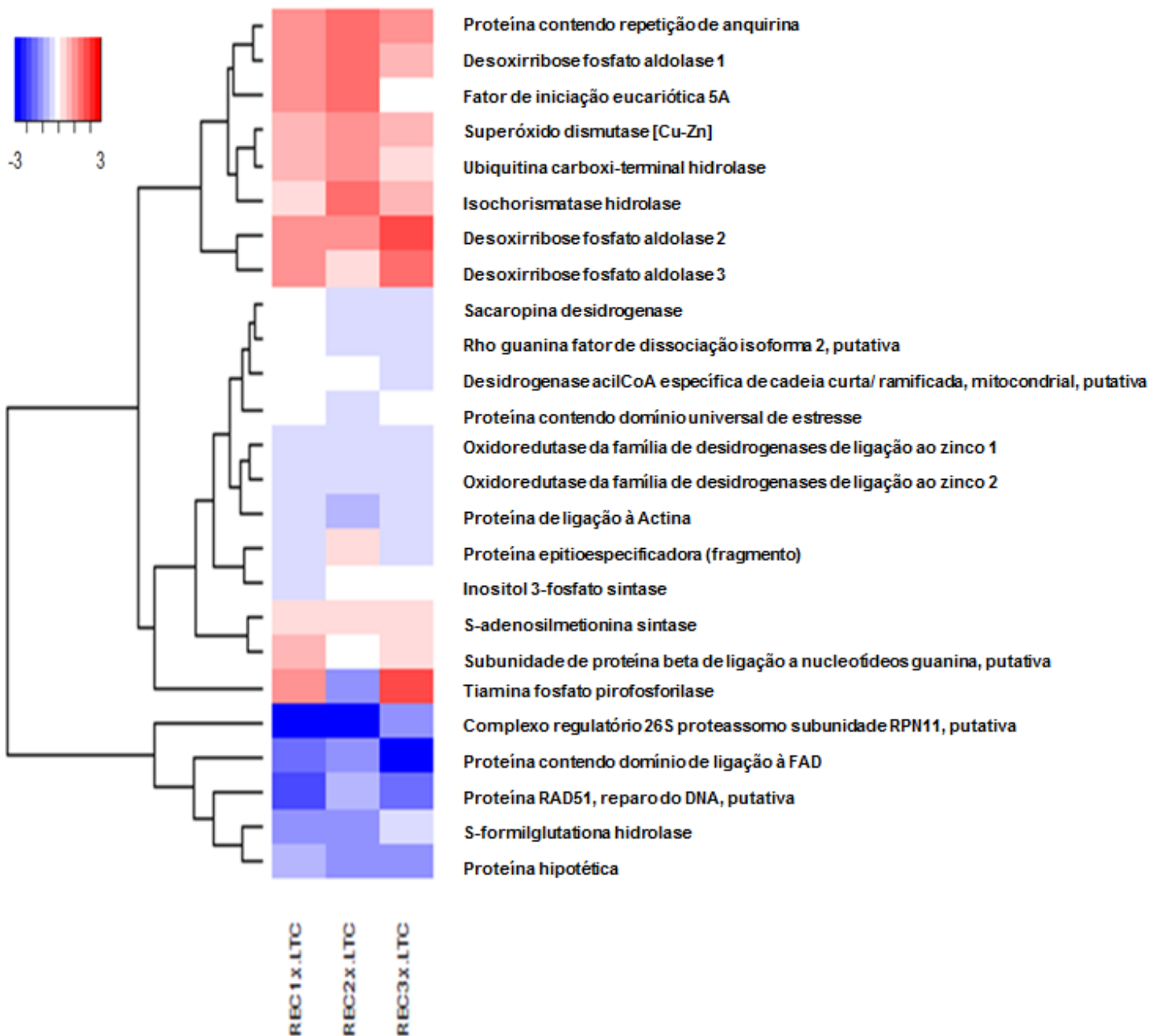
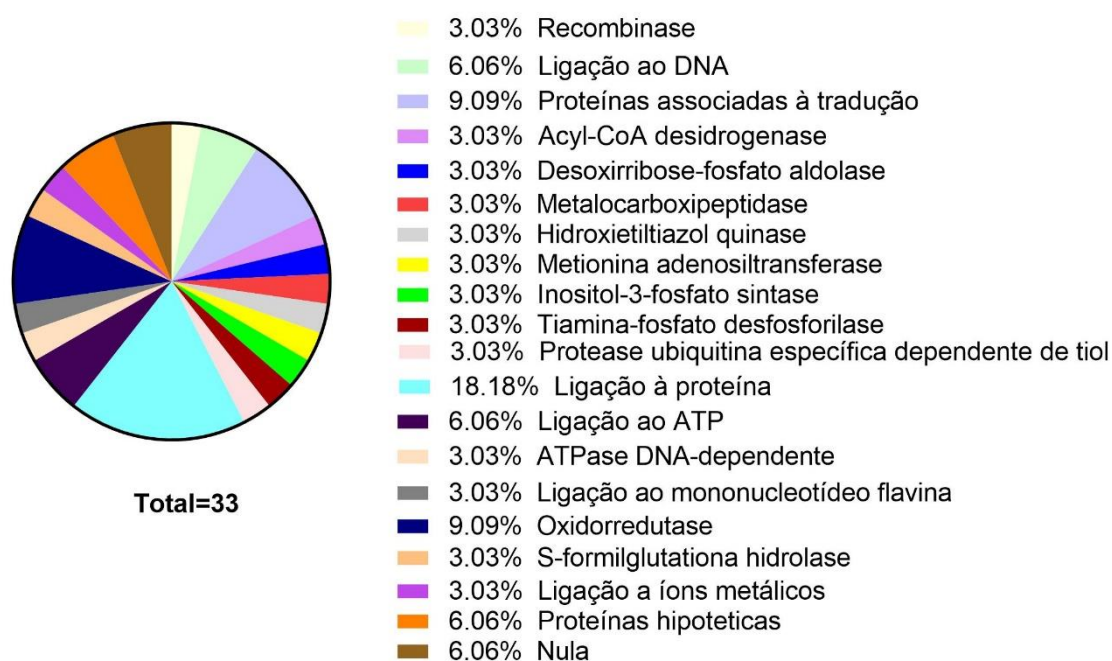
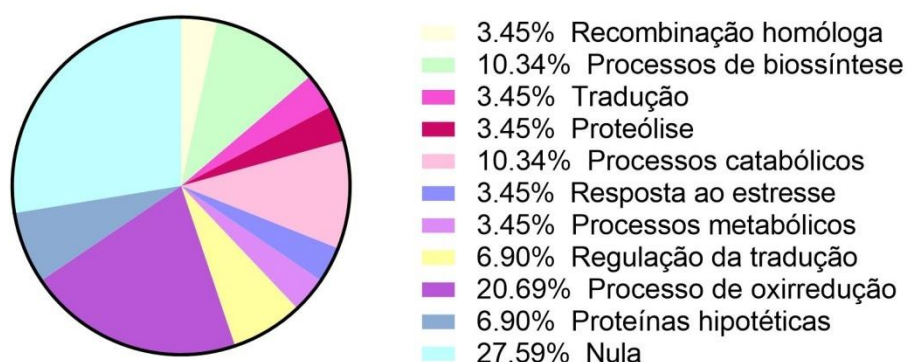


Figura 17: Heatmap da comparação do padrão de expressão das proteínas identificadas em ALXltc e nas culturas recuperadas ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3. Heatmap mostra o padrão de expressão em porcentagem de volume dos spots das proteínas identificadas na comparação das ALXltc e nas culturas recuperadas ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3. O dendograma indica o comportamento em *fold change* (\log_2) de cada proteína entre as diferentes culturas. As proteínas foram selecionadas por apresentarem spots com diferença estatística univariável (ANOVA) significativa entre os géis. Os *fold changes* foram calculados a partir do padrão de expressão em porcentagem de volume, em \log_2 , comparando a cultura de longo prazo (ALXltc), com as culturas recuperadas (ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3). Os valores variaram entre -3,0 (azul) a 3,0 (vermelho). Os *fold changes* com regulação discreta (valor entre -1 e 1) foram mostrados em branco. Os dados normalizados e o heatmap foram gerados através do software R x 64 3.1.3 utilizando o *scriptgplots/heatmap2*.

As proteínas diferencialmente identificadas foram agrupadas de acordo com sua função molecular e processo biológico anotados no *gene ontology* (GO) (**Anexo 3**). A maioria das proteínas (18,18%) possui a função molecular de ligação à proteína (**figura 18 A**) e (20,69%) atua em processos de oxirredução (**figura 18 B**). Foi possível observar algumas classes de proteínas já descritas como importantes na patogenia de *Acanthamoeba* como a Carboxipeptidase A1 que possui a função molecular de metalocarboxipeptidase (CLARKE; NIEDEKORN 2006). Duas proteínas não possuem anotação quanto a sua função. No entanto, por homologia de sequência com genomas para os quais a função molecular é conhecida e ao nome atribuído à essas proteínas em outros genomas, pode-se inferir suas funções moleculares como sendo associadas à inibidores de serino proteases e proteína associada ao estresse. Oito não apresentam GO para processos biológicos em *Acanthamoeba* (**tabela 5**), à essas proteínas foi associada GO nula.





Total=29

Figura 18: Gráfico de função molecular e processos biológicos das proteínas identificadas como diferencialmente e exclusivamente expressas em ALXltc, ALXrec1,ALXrec2 e ALXrec3. Com base nas anotações funcionais das proteínas no *gene ontology* as mesmas foram distribuídas nas categorias indicadas nos setores do círculo. As que não possuem anotação quanto a função molecular e processo biológico em *Acanthamoeba* no *gene ontology* foram categorizadas como nulas. A) Distribuição das proteínas pela sua função molecular anotada para *Acanthamoeba* no *gene ontology*. Um total de 33 categorias de GO para função molecular foi atribuído às proteínas, levando em consideração a ausência de categoria (Nula) e que algumas proteínas apresentam mais de uma GO associada. B) Distribuição das proteínas pelo processo biológico anotado para *Acanthamoeba* no *gene ontology*. Para processos biológicos vinte e nove categorias de GO foram associadas às proteínas.

Tabela 5: Proteínas sem anotação para função molecular e processo biológico em *Acanthamoeba*.

Gene para acesso	Proteína	Função Molecular
ACA1_368860	Proteína contendo domínio universal de estresse	Nula
ACA1_382620	Proteína de superfamília serpina (inibidor de serino proteinase)	Nula
Processo biológico		
ACA1_073080	Complexo regulatório 26S proteassomo subunidade RPN11, putativa	Nula
ACA1_109720	Proteína contendo domínio de calponina	Nula
ACA1_174240	Rho guanina fator de dissociação isoforma 2, putativa	Nula
ACA1_198360	Proteína epitioespecificadora	Nula
ACA1_199990	Subunidade de proteína beta de ligação a nucleotídeos guanina, putativa	Nula
ACA1_382620	Proteína de superfamília serpina (inibidor de serino proteinase)	Nula
ACA1_391670	Proteína contendo repetição de anquirina	Nula
ACA1_035360	Proteína de ligação à actina	Nula

6 DISCUSSÃO

A ceratite amebiana é uma grave infecção da córnea, causada por *Acanthamoeba*, um protozoário amplamente distribuído na natureza e que normalmente não causa nenhum dano, apesar do seu frequente contato com o ser humano (KHAN, 2006). O fato de *Acanthamoeba* se comportar como parasita depende de fatores próprios do isolado, mas também está relacionado com a oportunidade de contato entre o trofozoíto e células lesadas da córnea, pois é necessária uma injúria prévia no tecido para que haja infecção (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; HURT *et al.*, 2003). Alguns fatores e mecanismos de patogenia são atualmente reconhecidos, porém é provável que outras moléculas desempenhem papel relevante na doença, assim como observados em outros microrganismos. Sabe-se que as células lesadas da córnea induzem o trofozoíto de *Acanthamoeba* a produzir uma protease de 133 kDa (MIP133), após exposição a manose. A MIP133 é responsável pela apoptose de queratinócitos, células do corpo ciliar, células epiteliais do pigmento de retina, células do epitélio da córnea e células endoteliais da córnea (CLARKE; NIEDERKORN, 2006). Ressalta-se que em outros microrganismos, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Entamoeba histolytica*, esse processo de interação de lectinas de superfície com glicoproteínas do hospedeiro, durante a instalação da infecção, é similar (CLARKE, DANIEL W.; NIEDERKORN, 2006b; HUSTON, 2004; WU; GUPTA; HAZLETT, 1995). Em *Entamoeba histolytica*, por exemplo, o processo invasivo que causa úlceras intestinais, também é dependente de contato do trofozoítos com o enterócito. Muitas moléculas envolvidas na invasão são atualmente reconhecidas para essa ameba intestinal, como por exemplo, as lectinas específicas para Galactose/N-acetilgalactosamina. Uma família de cisteíno-proteases possui um papel muito importante para a invasão de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (HUSTON, 2004).

No presente trabalho, a análise comparativa do proteoma revelou 42 proteínas diferencialmente expressas em cultura de *Acanthamoeba* após recente exposição à moléculas, células e sistema imune do hospedeiro, por indução de processo invasivo, em relação à mesma amostra mantida em cultivo axênico prolongado, desde 2006 (DUARTE *et al.*, 2013). Sabe-se que o cultivo axênico prolongado atenua propriedades de virulência de *Acanthamoeba*, assim como de outros parasitos (VERÍSSIMO *et al.*, 2013; FAUST; GUILLEN, 2012) e, ao contrário a exposição a processo infeccioso em modelo animal pode ativar a expressão de fatores de virulência.

Inicialmente, para estabelecer o modelo de ceratite amebiana, foram inoculados trofozoítos da cepa em cultivo prolongado na córnea de ratos. Lesões

pequenas na primeira passagem foram observadas em três animais (dados não mostrados). Os trofozoítos recuperados nesta primeira infecção foram então inoculados novamente em modelo animal, e, após 6 dias, lesões maiores e mais intensas foram evidentes, indicando um possível aumento de virulência.

Estudos conduzidos em modelo de infecção sistêmica por *Acanthamoeba* tem demonstrado claramente esse aumento de virulência (MAZUR; HADAS, 1994; VERÍSSIMO *et al.*, 2013). Nos trabalhos de VERÍSSIMO *et al.*, 2013, trofozoítos de *Acanthamoeba* mantidos em cultivo axênico desde 2006 foram inoculados via intranasal em ratos Wistar, imunossuprimidos com injeção intraperitoneal de dexametasona para a infecção. Os trofozoítos recuperados dos tecidos foram inoculados nas mesmas condições anteriores, resultando em uma sobrevivência muito menor dos animais, comparando-se àqueles nos quais foi inoculada a cultura de longo tempo. Além disso, os protozoários foram visualizados por histopatologia nos pulmões, cérebro, fígado e rins dos animais, confirmando a recuperação de propriedades de virulência desses protozoários após infecção *in vivo* (VERÍSSIMO *et al.*, 2013). Dados similares foram reportados por outro estudo em que a infecção também foi conduzida por inoculação intracerebral (MAZUR; HADÁS, 1994). Sendo assim, o modelo de acantamebíase cerebral, até então, é o único em que é reportada recuperação de virulência, após inoculação em hospedeiro. No entanto, não foi conduzido ainda um estudo para verificar a recuperação de virulência em modelo de ceratite amebiana e identificação de quais fatores podem estar associados a esse perfil.

Em nossos experimentos, as culturas recuperadas de córnea foram cultivadas por até quatro repiques, visando o aumento escalonado de trofozoítos, para a obtenção de extrato proteico e posterior análise proteômica. Inicialmente, fez-se necessário definir o método mais adequado para a extração proteica incluindo os protocolos de lise por congelamento e descongelamento e por sonicação. Em concordância com estudos prévios de proteômica de *Acanthamoeba* (CAUMO *et al.*, 2004; BEHERA; SATPATHY, 2016), o método de sonicação mostrou-se mais adequado, resultando em mapas bidimensionais de melhor resolução. O inibidor de proteases escolhido foi o PMSF pela sua ação eficaz na inibição da atividade das serino proteases, abundantes em *Acanthamoeba* (KONG *et al.*, 2000; CLARKE; NIEDERKORN, 2006).

Na comparação entre os isolados ALXltc com ALXrec1, ALXrec2 e ALXrec3 245 spots demonstraram diferença estatística (valor de $p < 0,05$). Realizou-se, em seguida, uma seleção de quais desses spots seriam então submetidos à por espectrometria de massas para a identificação das proteínas. A presença de spots de boa resolução em pelo menos dois géis de cada triplicata técnica foi o critério de

seleção adotado. Na análise entre as culturas recuperadas ALXrec1, ALXrec2 e ALXrec3 136 *spots* apresentaram diferença estatística, seguindo os mesmos critérios de escolha 13 foram selecionados nessa análise. No total 62 *spots* foram enviados para identificação por espectrometria de massas. Destes, 42 foram identificados no banco de dados de *Acanthamoeba castellanii*. Um total de 12 proteínas estavam presentes na cultura de longo prazo e nos reisolados, mas apresentaram diferenças estatísticas somente quando foram comparados entre os reisolados. Vinte *spots* proteínas não foram identificadas no banco de dados de *Acanthamoeba*, mas foram identificadas no banco de dados não-redundante do NCBI. Embora não haja a sequência destas 20 proteínas na sequência do genoma depositado no Amoeba DB, apresentamos uma evidência experimental, com identificação por espectrometria de massas, da expressão destas proteínas, sugerindo que o genoma de *Acanthamoeba* apresenta ainda muitos *gaps*. Os dados destas 20 proteínas apresentadas nesta dissertação serão enviados ao Ameba DB para que nossa informação possa colaborar com o conteúdo informativo da base de dados. Em *Acanthamoeba*, relata-se a transferência lateral de genes, fenômeno que pode contribuir para que essas diferenças e achados possam ocorrer (CLARKE, MICHAEL *et al.*, 2013).

Entre as 30 proteínas identificadas a partir da comparação proteômica entre a cultura de longo prazo (ALXltc) e as culturas recuperadas (ALXrec1, ALXrec2 e ALXrec3), duas proteínas, posicionadas como *spots* distintos, foram identificadas mais de uma vez, na espectrometria, como a mesma proteína, sendo uma delas a oxidorreductase da família de desidrogenases de ligação ao zinco e a outra a desoxirribose fosfato aldolase. Tal fato pode ser explicado como resultante de modificações pós-traducionais, ainda não descritas na literatura para a primeira proteína. A primeira possui atividade de oxidorreductase e desempenha o processo biológico de transferência de elétrons de um substrato para uma molécula aceptora. A análise de expressão demonstrou que essa proteína foi regulada negativamente, mas nas culturas reisoladas. Desidrogenases atuam oxidando um substrato por meio da transferência de hidrogênio para uma molécula aceptora, normalmente NAD ou NADP. A modulação negativa dessa enzima nos reisolados pode estar associada à mudança na bioenergética celular, devido à transição da condição de cultura axênica para crescimento nos tecidos do hospedeiro, onde as tensões de oxigênio são mais baixas. É possível que o parasito, nesta condição, esteja gerando ATP por anaerobiose, justificando a redução da expressão de desidrogenase. Em um estudo do genoma de *Acanthamoeba castellanii* foram achadas enzimas, tais como ferredoxina oxidorreductase e FeFehidrogenase que, face à sua função, deram suporte aos autores para essa mesma hipótese, pois a detecção destas enzimas apontam para capacidade

crítica de produção de ATP anaeróbico em *Acanthamoeba* (CLARKE, MICHAEL *et al.*, 2013).

Em um estudo de modelagem computacional para sítios de modificações pós-traducionais em proteínas da bactéria *Thermus thermophilus* foi demonstrado um sítio de acetilação próximo ao sítio ativo da enzima desoxirribose fosfato aldolase. A montagem estrutural revela que o sítio de acetilação, que ocorre na lisina 151 dessa enzima, encontra-se em uma parte mais interna da estrutura (MASUI *et al.*, 2014). A acetilação é um evento de modificação pós-traducional, no qual, grupos acetila são adicionados à lisina pela ação de acetiltransferases e retirados pelas desacetilases (HYNDMAN; KNEPPER, 2017). É possível que a desoxirribose fosfato aldolase de *Acanthamoeba* identificada a partir de *spots* distintos seja oriunda de modificações pós-traducionais como a acetilação, resultando em migração distinta na eletroforese.

A desoxirribose fosfato aldolase possui a função molecular de ligação ao íon cálcio e também função de catabolismo de desoxinucleotídeos em *Acanthamoeba*. Essa enzima possui como substrato 2-desoxi-D-ribose 5-fosfato, principal açúcar produzido durante o catabolismo de desoxinucleotídeos, gerando gliceraldeído 3-fosfato e acetaldeído. Em outros microrganismos como bactérias, essa proteína atua na produção de energia pela degradação dos desoxirribonucleotídeos (HAN; ZHU; DAO, 2004), pela via das pentose fosfato. Na análise de expressão representada pelo *heatmap* (Figura 17), visualizou-se um perfil de regulação positiva nas culturas reisoladas, em comparação com a cultura de longo prazo. No entanto, Huang e colaboradores (2016), ao comparar o secretoma de uma cultura padrão ATCC_30010 com isolados provenientes de infecção e encontraram a desoxirribose fosfato aldolase na cultura padrão, mas não detectaram nos isolados virulentos.

Consistente com a hipótese de que a cultura de longo prazo, mais adaptada às condições axênicas, prolifere mais e, portanto, tenha uma demanda maior por produção de energia e que as culturas recuperadas, ao contrário, modulem a expressão gênica para lidar com o menor estresse oxidativo endógeno, destaca-se nas culturas recuperadas a expressão reduzida concomitante de algumas proteínas associadas aos processos de oxidoredução, tais como proteína com domínio de ligação ao FAD, acetil-COA desidrogenase e sacaropina desidrogenase. Essa última enzima condensa lisina com alfa-ceto-glutarato (ciclo de Krebs *de novo*) e pouco se sabe sobre sua função em *Acanthamoeba*. Ressalta-se que a superóxido dismutase de *Acanthamoeba castellanii* está mais expressa nos reisolados, mas é uma enzima associada tanto à resistência ao estresse oxidativo endógeno, bem como ao exógeno (KIM, JUNG-YEON *et al.*, 2012).

Proteínas já descritas na literatura como importantes fatores de virulência em *Acanthamoeba* foram encontradas exclusivamente nas culturas recuperadas das lesões de CA e, portanto não foram incluídas na análise de *heatmap*. A carboxipeptidase A1 é uma metaloprotease que possui o motivo de ligação ao zinco e desempenha o processo biológico de proteólise (GOMIS-RÜTH, 2003). As metaloproteases estão envolvidas na degradação do estroma da córnea e de componentes da matriz extracelular no processo de invasão por *Acanthamoeba* (CLARKE, DANIEL W.; NIEDERKORN, 2006b; ITOH; SEIKI, 2002). A produção dessas enzimas ocorre em resposta à lesão da córnea, sendo as pro-metaloproteases ativadas por clivagem proteolítica no espaço extracelular. Essas enzimas produzem ulceração da córnea pela degradação de componentes da membrana basal e da matrix extracelular, como colágenos de tipos I e II, fibronectina e laminina. Em infecções de córnea provenientes de outros microrganismos, como a ceratite herpética, várias metaloproteases de matrix estão envolvidas na destruição do tecido da córnea (YANG *et al.*, 2003).

As serino proteases também são descritas como importantes no processo de invasão e desenvolvimento da ceratite amebiana. Possuem a capacidade de degradar colágeno tipo I e IV e fibronectina, dentre outros componentes da matrix extracelular (KONG *et al.*, 2000), mas, curiosamente, nenhuma serino protease foi encontrada no proteoma dos parasitos analisados. Ao contrário, a presença de uma proteína inibidora de serino proteases foi detectada em duas das culturas recuperadas, não estando presente na LTC. A proteína de superfamília serpina era, até então descrita apenas no genoma da *Acanthamoeba*, não tendo anteriormente sido identificada como proteína expressa neste protozoário, e não possui função molecular e processo biológico anotados no *gene ontology* para *Acanthamoeba*. As serpinas são pertencentes à família de inibidores de serino-proteases eficientes em inibir a ação dessa classe de proteases (CARRELL; TRAVIS, 1985). Algumas serpinas são descritas como importantes fatores de virulência em vírus. A *serp1* tem ação na inibição de moléculas envolvidas na modulação da resposta inflamatória do hospedeiro e *serp2* tem ação anti-inflamatória e também interfere na apoptose celular no vírus Mixoma (GUERIN *et al.*, 2001; MOON; TURNER; MOYER, 1999). Assim, pode-se sugerir que a maior expressão de serpina pelos isolados de *Acanthamoeba* possa estar associada à inibição da resposta inflamatória do hospedeiro, potencializando o processo infeccioso desses isolados.

A S-adenosilmetionina sintase é uma enzima envolvida na síntese de S-adenosilmetionina, composto que participa em vários processos biológicos, como controle da transcrição por meio da metilação do DNA (BAUMGARDT *et al.*, 2017;

THOMAS *et al.*, 1995). Essa enzima foi detectada com maior expressão nos trofozoitos recuperados, possivelmente relacionada à demanda por alterações na expressão gênica, face à necessidade de adaptação ao novo ambiente.

Ubiquitina carboxi-terminal hidrolase é uma cisteína protease cuja função molecular corresponde à protease específica dependente de tiol em *Acanthamoeba*. A análise de expressão dessa proteína demonstrou uma regulação positiva nas culturas recuperadas, em relação com a cultura de longo prazo. Ubiquitinas C-terminal hidrolases são enzimas desubiquitinadoras que clivam especificamente monômeros de substratos conjugados com ubiquitina. Conseqüentemente, possuem ação antagonista às proteínas ubiquitinadoras, que marcam outras proteínas e peptídeos para serem degradados (NIJAN *et al.*, 2005; DIRAC *et al.*, 2005; AMERICK; SINDIHI; HOCHSTRASSER, 2006). Em leveduras as ubiquitinas C-terminal hidrolases são frequentemente encontradas em associação com o proteassoma 26S. Possuem um papel importante na regulação da atividade pela interação com componentes desse proteassoma como o RPN12s dentre outros (TIAN *et al.*, 2012). Como a ubiquitinação tem importante papel na regulação da expressão gênica, é plausível que esta proteína esteja regulada positivamente pela maior demanda de regulação da expressão gênica nos reisolados, face à necessidade de adaptação ao novo ambiente. Já em *Entamoeba histolytica*, as cisteína proteases dependentes de tiol (ECPHs), tem ação no muco colônico humano, culminando com o aumento da adesão dos trofozoítos às células hospedeiras (HUSTON, 2003).

O Complexo regulatório 26S proteassomo subunidade RPN11 apresentou uma menor expressão nos reisolados. Em *Acanthamoeba*, essa proteína está anotada para a função molecular de ligação a outra proteína, sem GO para processo biológico. Em outros microrganismos, como *Candida glabrata* e *Encephalitozoon cuniculi*, diversos processos biológicos estão anotados como, por exemplo, desubiquitinação. Nesse processo, ocorre a regulação de degradação proteica, pela retirada de ubiquitinas, evitando assim que proteínas erroneamente marcadas com poliubiquinação sejam degradadas. Considerando a expressão reduzida nas culturas recuperadas, é possível inferir que ocorreu maior demanda por regulação de degradação proteica, face à necessária regulação de expressão promovida pela mudança do ambiente ao qual a cultura original passou a ser exposta, após o contato com o organismo hospedeiro.

A proteína de reparo de DNA, RAD51 também foi detectada com regulação negativa nos reisolados. Essa proteína é capaz de reparar eficientemente danos nas fitas duplas de DNA, por meio de recombinação homóloga. Também possui ação para impedir que as forquilha de replicação sejam desfeitas ao encontrar quebras no DNA.

A RAD51 invade a cadeia de DNA através da formação de um filamento proteico com as fitas simples e busca as fitas homologas ao DNA danificado para o reparo. Esse processo forma um *loop* onde a quebra nas duplas fitas é reparada (HEYER, 2007; SUNG; KLEIN, 2006).

Uma outra proteína identificada como associada ao estresse oxidativo foi a proteína contendo domínio universal de estresse. As proteínas que contêm domínio de estresse universal (USPs) constituem um grupo de proteínas que são expressas em resposta a condições adversas a sobrevivência de alguns microrganismos. Em bactéria, por exemplo, várias USPs estão relacionadas com a capacidade da adaptação ao estresse oxidativo, altas temperaturas e a sobrevivência em pHs ácidos. Tais fatores conferem as USPs um papel relevante na patogenicidade e sobrevivência de bactérias a fatores adversos, como descrito em *Salmonella* (LIU *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2011). Em *Acanthamoeba*, o processo biológico anotado para essa proteína é a resposta ao estresse. No entanto, a diferença na expressão dessa proteína entre a cultura de longo prazo e os reisolados foi discreta.

Doze proteínas apresentaram diferença estatística apenas ao comparar as culturas recuperadas de lesão entre si (ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3). Resultados de diferença de expressão proteica entre as amostras recuperadas eram esperados visto que cada amostra foi recuperada de lesões distintas de córnea, resultando em variabilidade biológica. Dentre as proteínas identificadas, seis são hipotéticas e não possuem função conhecida em *Acanthamoeba*. As proteínas 3-hidroxibutirato desidrogenase e serino 3-desidrogenase desempenham a função de oxirredução já abordadas anteriormente. Algumas dessas proteínas encontradas reforçam a hipótese da exposição dos trofozoítos a fatores como estresse exógeno para o desenvolvimento da infecção.

Considerando os resultados encontrados nesse estudo pode-se inferir que *Acanthamoeba* modula de forma significativa a expressão de várias proteínas durante sua interação com o hospedeiro na ceratite amebiana. Cumpre mencionar que é possível que as diferenças observadas decorrentes da mudança de ambiente e do contato com o hospedeiro tenham sido atenuadas, pelo retorno ao cultivo axênico, já que para a obtenção de grandes quantidades de proteína passagens em cultura foram necessárias. As passagens sucessivas possivelmente podem levar a alteração de outros parâmetros não contemplados nesse estudo.

Finalmente, ressalta-se também que este trabalho corresponde ao primeiro estudo proteômico que demonstrou a modulação de proteínas de trofozoítos de *Acanthamoeba* na instalação da CA, fornecendo relevantes informações a cerca da

expressão desses grupos protéicos. Outra contribuição significativa refere-se às proteínas hipotéticas detectadas. Estudos posteriores poderão elucidar melhor o seu papel na biologia de *Acanthameoba*.

7 CONCLUSÃO

A partir do estabelecimento de um modelo de desenvolvimento de ceratite amebiana em ratos e análise do proteoma, os resultados encontrados, permitem concluir que, *Acanthamoeba* modula a expressão de várias proteínas associadas principalmente ao metabolismo energético, à atividade proteolítica, ao controle da expressão gênica, pela degradação de proteínas ou metilação do DNA, à resposta ao estresse e reparo do DNA, para adaptação ao novo ambiente, resistência aos mecanismos imunes do hospedeiro, promovendo lesões teciduais.

REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD, Ruedi *et al.* Applications and Developments in Targeted Proteomics: From SRM to DIA/SWATH. **Proteomics** v. 16, n. 15–16, p. 2065–2067 , 2016
- AEBERSOLD, Ruedi; MANN, Matthias. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. **Nature** v. 537, n. 7620, p. 347–355 , 2016.
- AKPEK, G. *et al.* Granulomatous amebic encephalitis: An under-recognized cause of infectious mortality after hematopoietic stem cell transplantation. **Transplant Infectious Disease** v. 13, n. 4, p. 366–373 , 2011.
- AL-HERRAWY, A. *et al.* Morpho-Physiological and biochemical criteria of Acanthamoeba spp. isolated from the Egyptian aquatic environment. **Iranian Journal of Parasitology** v. 8, n. 2, p. 302–312 , 2013.
- APPEL, R D *et al.* Federated 2-dimensional electrophoresis database - simple means of publishing 2-dimensional electrophoresis data. **Electrophoresis** v. 17, n. 3), p. 540–546 , 1996.
- AZZAM, Rula *et al.* Acanthamoeba encephalitis: Isolation of genotype t1 in mycobacterial liquid culture medium. **Journal of Clinical Microbiology** v. 53, n. 2, p. 735–739 , 2015.
- BAUMGARDT, Kathrin *et al.* RNase E and RNase J are needed for S-adenosylmethionine homeostasis in Sinorhizobium meliloti. **Microbiology (Reading, England)** v. 163, n. 4, p. 570–583 , 1 abr. 2017.
- BEHERA, Himansu Sekhar; SATPATHY, Gita. Characterisation and expression analysis of trophozoite and cyst proteins of Acanthamoeba spp. isolated from Acanthamoeba keratitis (AK) patient. **Molecular and Biochemical Parasitology** v. 205, n. 1–2, p. 29–34 , 2016.
- BORATTO, Paulo *et al.* Acanthamoeba polyphaga Mimivirus Prevents Amoebal Encystment-Mediating Serine Proteinase Expression and Circumvents Cell Encystment. **Journal of Virology** v. 89, n. 5, p. 2962–2965 , 2015.
- BOUYER, Sabrina *et al.* Acanthamoeba castellanii: Proteins involved in actin dynamics, glycolysis, and proteolysis are regulated during encystation. **Experimental Parasitology** v. 123, n. 1, p. 90–94 , 2009.
- BOWERS, B; KORN, E D. The fine structure of Acanthamoeba castellanii. **The Journal of cell biology** v. 39, n. 1, p. 95–111 , 1968.
- CARRELL, Robin; TRAVIS, James. α 1-Antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. **Trends in Biochemical Sciences** v. 10, n. 1, p. 20–24 , 1985.
- CARVALHO, F R S *et al.* Twenty years of acanthamoeba keratitis. **Cornea** v. 28, n. 5,

p. 516–519 , 2009.

CAUMO, Karin Silva *et al.* Proteomic profiling of the infective trophozoite stage of *Acanthamoeba polyphaga*. **Acta Tropica** v. 140, p. 166–172 , 2014.

CHIDAMBARAM, Jaya D *et al.* Prospective Study of the Diagnostic Accuracy of the In Vivo Laser Scanning Confocal Microscope for Severe Microbial Keratitis. **Ophthalmology** v. 123, n. 11, p. 1–9 , 2016.

CLARKE, Daniel W.; NIEDERKORN, Jerry Y. The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Microbes and Infection** v. 8, n. 5, p. 1400–1405 , 2006.

CLARKE, Daniel W.; NIEDERKORN, Jerry Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Trends in Parasitology** v. 22, n. 4, p. 175–180 , 2006

CLARKE, Michael *et al.* Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. **Genome biology** v. 14, n. 2, p. R11 , 2013.

COELHO, Camila Henriques *et al.* Morphological and physiological characteristics of a virulent and zoonotic assemblage A *Giardia duodenalis* canine strain. **Acta Tropica** v. 174, n. February, p. 76–81 , 2017.

CORSARO, Daniele *et al.* *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). **Parasitology Research** v. 114, n. 7, p. 2481–2490 , 2015.

COSTA, Adriana O. *et al.* Characterization of *acanthamoeba* isolates from dust of a public hospital in curitiba, paran, Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology** v. 57, n. 1, p. 70–75 , 2010.

CULBERTSON, C. G.; SMITH, J. W.; MINNER, J. R. *Acanthamoeba*: Observations on Animal Pathogenicity. **Science** v. 127, n. 3313, p. 1506 , 1958.

DA ROCHA-AZEVEDO, Bruno; TANOWITZ, Herbert B.; MARCIANO-CABRAL, Francine. Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases** v. 2009, p. 1–14 , 2009.

DART, John K G; SAW, Valerie P J; KILVINGTON, Simon. *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis and Treatment Update 2009. **American Journal of Ophthalmology** v. 148, n. 4, p. 487–499.e2 , 2009.

DI PALMA, Serena *et al.* Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. **Journal of Proteomics** v. 75, n. 13, p. 3791–3813 , 2012.

DONATO, P. *et al.* Comprehensive chromatographic separations in proteomics. **Journal of Chromatography A** v. 1218, n. 49, p. 8777–8790 , 2011.

DUARTE, Juliana L. *et al.* Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. **Experimental Parasitology** v. 135, n. 1, p. 9–14 , 2013.

ERIKSSON, Jan; FENYÖ, David. Improving the success rate of proteome analysis by modeling protein-abundance distributions and experimental designs. **Nature Biotechnology** v. 25, n. 6, p. 651–655 , 2007.

GOMIS-RÜTH, F. Xavier. Structural Aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases. **Molecular Biotechnology** v. 24, n. 2, p. 157–202 , 2003.

GREGORY, R. Warnes *et al.* Various R Programming Tools for Plotting Data: description Various R programming tools for plotting data, Package 'gplots', 'heatmap.2', . v. Version 2.17.0, 2015.

GRIFFITHS, Antony J.F; *et al.* Proteína e sua síntese. **Introdução à genética**. Décima ed. New York, 2012. p. 283–287.

GUANG, Matthew Ho Zhi *et al.* Overcoming multiple myeloma drug resistance in the era of cancer omics **Leukemia & Lymphoma** v. 0, n. 0, p. 1–20 , 2017.

GUERIN, J. L. *et al.* Characterization and functional analysis of Serp3: A novel myxoma virus-encoded serpin involved in virulence. **Journal of General Virology** v. 82, n. 6, p. 1407–1417 , 2001.

GUY, G R; PHILIP, R; TAN, Y H. Analysis of cellular phosphoproteins by two-dimensional gel electrophoresis: applications for cell signaling in normal and cancer cells. **Electrophoresis** v. 15, n. 3–4, p. 417–40 , 1994.

HAN, Thomas K; ZHU, Zhiwen; DAO, My Lien. Identification, molecular cloning, and sequence analysis of a deoxyribose aldolase in *Streptococcus mutans* GS-5. **Current microbiology** v. 48, n. 3, p. 230–6 , 1 mar. 2004.

HEYER, Wolf Dietrich. Biochemistry of eukaryotic homologous recombination. **Topics in Current Genetics** v. 17, p. 251–283 , 2007.

HUANG, Jian Ming *et al.* Comparative proteomic analysis of extracellular secreted proteins expressed by two pathogenic *Acanthamoeba castellanii* clinical isolates and a non-pathogenic ATCC strain. **Experimental Parasitology** v. 166, p. 60–67 , 2016.

HURT, Michael *et al.* Pathogenic *Acanthamoeba* spp. Secrete a Mannose-Induced Cytolytic Protein that Correlates with the Ability to Cause Disease. **Infection and Immunity** v. 71, n. 11, p. 6243–6255 , 2003.

HUSTON, Christopher D. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. **Trends in Parasitology** v. 20, n. 1, p. 23–26 , 2004.

ITOH, Yoshifumi; SEIKI, Motoharu. Chapter 6 MEMBRANE-TYPE MATRIX. p. 109–

124 , 2002.

KHAN, Naveed A. Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. **Current Microbiology** v. 43, n. 6, p. 391–395 , 2001.

KHAN, Naveed A.; PAGET, Timothy A. Molecular tools for speciation and epidemiological studies of *Acanthamoeba*. **Current Microbiology** v. 44, n. 6, p. 444–449 , 2002.

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

KHAN, Naveed Ahmed; SIDDIQUI, Ruqaiyyah. Predator vs aliens: bacteria interactions with *Acanthamoeba*. **Parasitology** v. 141, n. 7, p. 869–874 , 2014.

KHAN, Naveed Ahmed; TAREEN, Noor Khan. pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. p. 97–104 , 2003.

KIM, Jung-Yeon *et al.* Functional expression and characterization of an iron-containing superoxide dismutase of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology research** v. 111, n. 4, p. 1673–82 , 2012.

KIM, Won Tae *et al.* Comparison of specific activity and cytopathic effects of purified 33 kDa serine proteinase from *Acanthamoeba* strains with different degree of virulence. **The Korean journal of parasitology** v. 44, n. 4, p. 321–330 , 2006.

KONG, H H; KIM, T H; CHUNG, D I. Purification and characterization of a secretory serine proteinase of *Acanthamoeba healyi* isolated from GAE. **The Journal of parasitology** v. 86, n. 1, p. 12–17 , 2000.

KUSSMANN, Martin; RAYMOND, Frédéric; AFFOLTER, Michael. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. **Journal of Biotechnology** v. 124, n. 4, p. 758–787 , 2006.

LENSTRA, Johannes A.; BLOEMENDAL, Hans. Topography of the total protein population from cultured cells upon fractionation by chemical extractions. **European Journal of Biochemistry** v. 135, n. 3, p. 413–423 , 1983.

LORENZO-MORALES, Jacob *et al.* *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. **Acta Tropica** v. 100, n. 1–2, p. 63–69 , 2006.

LORENZO-MORALES, Jacob; KHAN, Naveed A; WALOCHNIK, Julia. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite (Paris, France)** v. 22, p. 10 , 2015.

MACIVER, Sutherland 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** v. 49, n. 2, p. 217–221 , 2013.

MAGNET, A. *et al.* Novel Acanthamoeba 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. **Parasitology Research** v. 113, n. 8, p. 2845–2850 , 2014.

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

MARUJO, Fábio Iglesias *et al.* Distribuição das ceratites infecciosas em hospital terciário no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia** v. 76, n. 6, p. 370–373 , 2013.

MASUI, Ryoji *et al.* Structural insights of post-translational modification sites in the proteome of Thermus thermophilus. **Journal of structural and functional genomics** v. 15, n. 3, p. 137–151 , 2014.

MAYCOCK, Nicholas J R; JAYASWAL, Rakesh; ED, Fracs. Update on Acanthamoeba Keratitis : Diagnosis , Treatment , and Outcomes. v. 35, n. 5, p. 713–720 , 2016.

MAZUR, T.; HADAŚ, E. The effect of the passages of Acanthamoeba strains through mice tissue on their virulence and its biochemical markers. **Parasitology Research** v. 80, n. 5, p. 431–434 , 1994.

MOLLOY, M P *et al.* Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis** v. 19, n. 5, p. 837–844 , 1998.

MOON, K B; TURNER, P C; MOYER, R W. SPI-1-dependent host range of rabbitpox virus and complex formation with cathepsin G is associated with serpin motifs. **J Virol** v. 73, n. 11, p. 8999–9010 , 1999.

MORIYAMA, Aline Silveira; HOFLING-LIMA, Ana Luisa. Contact lens-associated microbial keratitis. **Arquivos brasileiros de oftalmologia** v. 71, n. 6 Suppl, p. 32–6 , 2008.

O'FARRELL, P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of biological chemistry** v. 250, n. 10, p. 4007–21 , 1975.

PAGE, F.C (Institute of Terrestrial ecology). **A new key to Frashwater and soil Gymnamoeba**, 1988. 120

PEDERSEN, Martin H. *et al.* Downregulation of antigen presentation-associated pathway proteins is linked to poor outcome in triple-negative breast cancer patient tumors. **Oncolmmunology** n. April, p. 00–00 , 2017.

PERDEW, Gary H.; SCHAUP, Henry W.; SELIVONCHICK, Daniel P. The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes. **Analytical Biochemistry** v. 135, n. 2, p. 453–455 , 1983.

RABILLOUD, Thierry. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis** v. 19, n. 5, p. 758–760 ,

REN, Meiyu; WU, Xinyi. Evaluation of three different methods to establish animal models of Acanthamoeba keratitis. **Yonsei medical journal** v. 51, n. 1, p. 121–7 , 2010.

ROGOWSKA-WRZESINSKA, Adelina *et al.* 2D gels still have a niche in proteomics. **Journal of Proteomics** v. 88, p. 4–13 , 2013.

SIDDIQUI, Ruqaiyyah; KHAN, Naveed Ahmed. Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. **Parasites & Vectors** v. 5, n. 1, p. 6 , 2012.

SILVERSTEIN, Robert M; WEBSTER, Francis X;; KIEMLE, David J. Espectrometria de massas. **Identificação Espectrometria de Compostos Orgânicos**. Sétima ed. New York, 2006. p. 1–7.

SUNG, Patrick; KLEIN, Hannah. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. **Nature reviews. Molecular cell biology** v. 7, n. 10, p. 739–750 , 2006.

TEIXEIRA-GOMES, A. *et al.* Mapping and identification of Brucella melitensis protein by 2D electrophoresis and microsequencing. **Electrophoresis** v. 18, n. 1, p. 156–162 , 1997.

THOMAS, D *et al.* Met30p, a yeast transcriptional inhibitor that responds to S-adenosylmethionine, is an essential protein with WD40 repeats. **Molecular and cellular biology** v. 15, n. 12, p. 6526–6534 , 1995.

TODA, T *et al.* Detection of thymopoietin-responsive proteins in nude mouse spleen cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and image processing. **Electrophoresis** v. 15, n. 7, p. 984–7. , 1994.

TOLEDO, Juliano S. *et al.* Cell homeostasis in a Leishmania major mutant overexpressing the spliced leader RNA is maintained by an increased proteolytic activity. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology** v. 42, n. 10, p. 1661–1671 , 2010.

TRAN, John C *et al.* Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. **Nature** v. 480, n. 7376, p. 254–8 , 2011.

VERCAUTEREN, F. G G; ARCKENS, L.; QUIRION, R. Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis. **Amino Acids** v. 33, n. 3, p. 405–414 , 2007.

VERÍSSIMO, Carolina De Marco *et al.* Infection in a rat model reactivates attenuated virulence after long-term axenic culture of Acanthamoeba spp. **Memorias do Instituto**

Oswaldo Cruz v. 108, n. 7, p. 832–835 , 2013.

VOSHOL, Hans; AG, Novartis Pharma. Towards high performance two-dimensional gel electrophoresis using ultrazoom gels Proteomics and 2-DE. **Electrophoresis** v. 21, p. 2617–2621 , 2000.

WASINGER, Valerie C *et al.* Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis** v. 16, n. 1, p. 1090–1094 , 1995.

WILDGRUBER, Robert *et al.* Towards higher resolution: Two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. **Electrophoresis** v. 21, n. 13, p. 2610–2616 , 2000.

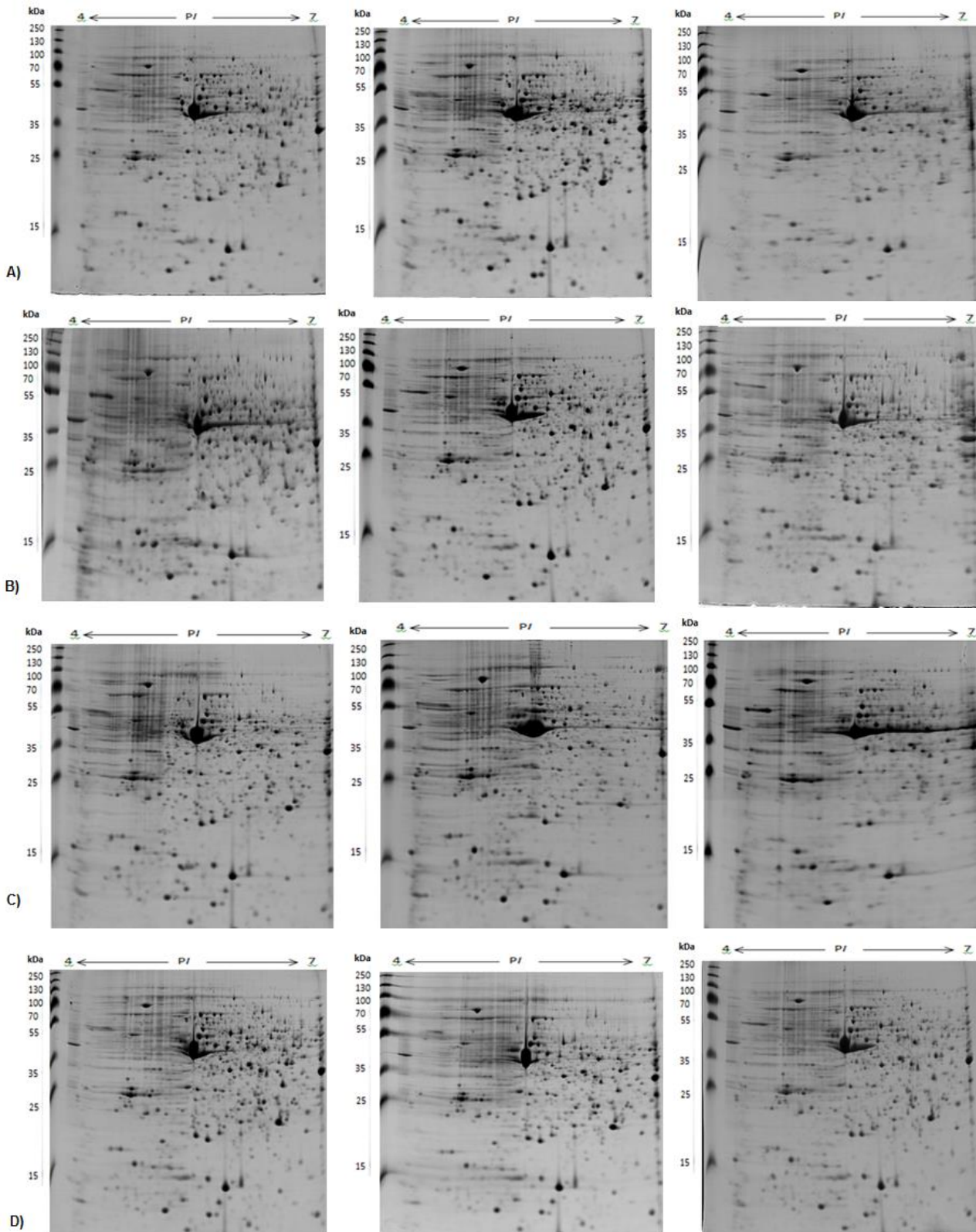
WILKINS, Marc R. *et al.* Guidelines for the next 10 years of proteomics. **Proteomics** v. 6, n. 1, p. 4–8 , 2006.

WILKINS, Marc R. *et al.* Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews** v. 13, n. July 2015, p. 19–50 , 1996.

WU, X; GUPTA, S K; HAZLETT, L D. Characterization of *P. aeruginosa* pili binding human corneal epithelial proteins. **Curr Eye Res** v. 14, n. 10, p. 969–977 , 1995.

YANG, Yan Ning *et al.* Matrix metalloproteinases (MMP-2 and 9) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1 and 2) during the course of experimental necrotizing herpetic keratitis. **Experimental Eye Research** v. 77, n. 2, p. 227–237 , 2003.

ANEXO 1



Triplicatas técnicas dos géis bidimensionais em gradiente de pH 4-7 de 13 cm das proteínas totais da (A) cultura de longo prazo ALXltc, (B) ALXrec1, (C) ALXrec2, (D), ALXrec3.

ANEXO 2

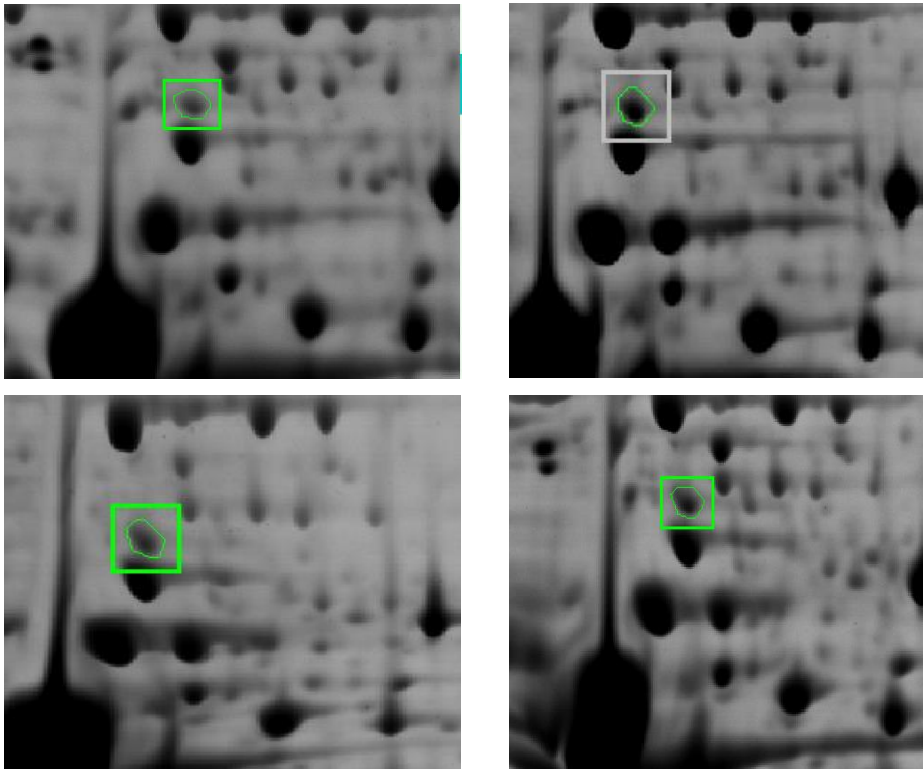
Spots indicados nos géis bidimensionais como diferencialmente expressos.

Identificação do Spot	Proteína	Gene para acesso	PI experimental	PI teórico	MM experimental	MM teórico
309	Inositol 3-fosfato sintase	ACA1_058810	3,90594	5,26	54,83	57,797
336	Proteína contendo domínio de ligação à FAD	ACA1_080550	6,27608	5,97	62	66,4
444	Sacaropina desidrogenase	ACA1_310610	6,13554	6,15	46,67	50,53
547	S-adenosilmetionina sintase	ACA1_091670	6,36633	6,37	40,67	42,846
587	Alfa-galactosidase	ACA1_131240	5,28037	6,23	46,57	42,48
624	Desidrogenase acilCoA específica de cadeia curta/ ramificada, mitocondrial, putativa	ACA1_384630	5,82623	7,67	37	45,6
648	Oxidoreductase da família de desidrogenases de ligação ao zinco	ACA1_314990	4,11559	6,16	35	38,498
650	Oxidoreductase da família de desidrogenases de ligação ao zinco	ACA1_314990	5,84618	6,16	34,83	38,498
678	Proteína RAD51, reparo do DNA, putativa	ACA1_201650	3,70649	5,51	34,6	37,508
722	Complexo regulatório 26S proteassomo subunidade RPN11, putativa	ACA1_073080	4,70858	6,24	32,5	35,03
786	Proteína de superfamília Serpina (inibidor de serino proteinase)	ACA1_382620	6,2187	6,19	36	40,24
824	S-formilglutamina hidrolase	ACA1_264380	5,53663	6,56	24,67	31,51
847	Proteína contendo domínio universal de estresse	ACA1_368860	6,00	6,57	23	26,64
861	Ubiquitina carboxi-terminal hidrolase	ACA1_378160	3,03905	4,38	23,2	26,782
910	Proteína hipotética	ACA1_245960	5,80421	10,18	21,3	14,65
923	Carboxipeptidase A1, putativa	ACA1_399750	5,95028	6,01	30	47,681
929	CBS domain containing protein	ACA1_325450	6,53169	6,67	30	35,218
941	Rho guanina fator de dissociação isoforma 2, putativa	ACA1_174240	5,16722	6,06	19,5	22,872
972	Tiamina fosfato pirofosforilase	ACA1_061790	4,3193	6,93	16,2	48,71
981	BadF/BadG/BcrA/BcrD ATPase proteína de superfamília	ACA1_154210	5,58709	8,42	27	38,682
982	Proteína epitioespecificadora (fragmento)	ACA1_198360	5,62305	6,4	30,83	37,512

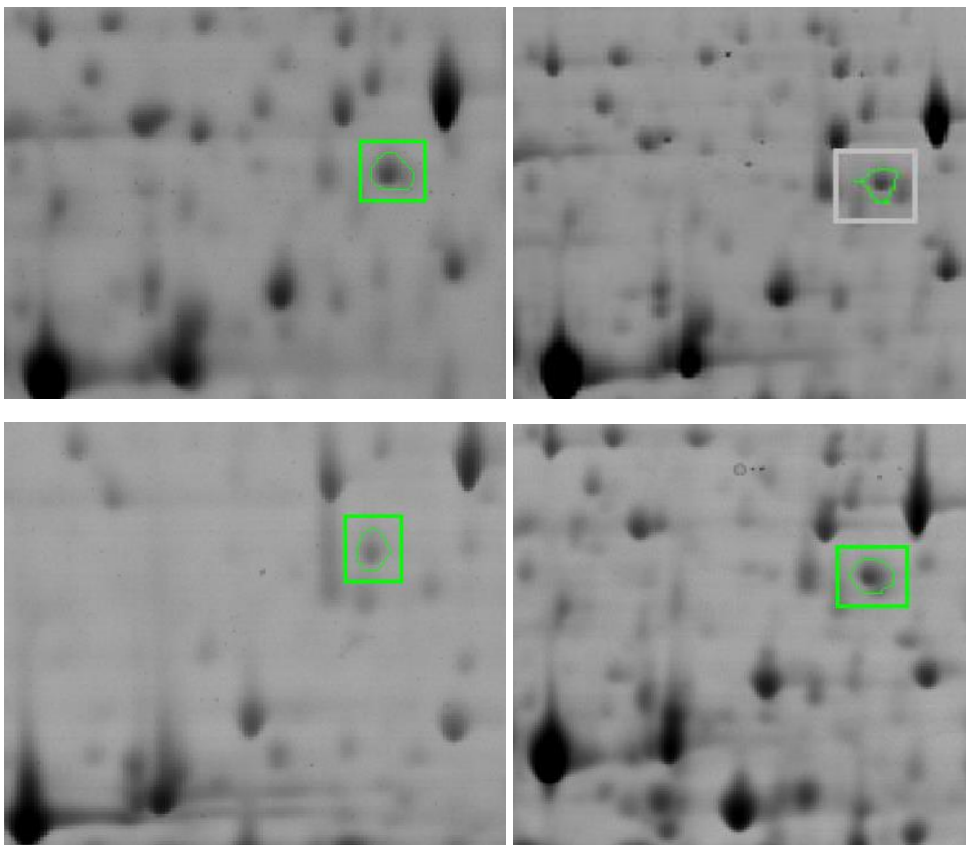
987	Proteína hipotética	ACA1_208120	4,24345	5,24	28,4	36,06
997	Superóxido dismutase [Cu-Zn] Proteína do tipo TolA	ACA1_048530	5,703	6,76	14,50	16,48
1010		ACA1_224400	4,42788	7,1	26,2	33,202
1021	Proteína de ligação à Actina	ACA1_035360	4,93437	7,72	12,5	14,46
1026	Subunidade de proteína beta de ligação a nucleotídeos guanina, putativa	ACA1_199990	6,6024	6,48	28,83	35,54
1037	Serina 3-desidrogenase	ACA1_276080	6,79472	6,67	24,5	22,076
1074	Proteína hipotética	ACA1_378250	6,70285	9,31	24	30,74
1196	Proteína contendo domínio universal de estresse	ACA1_368860	6,1124	6,57	22	26,64
1197	Desoxirribose fosfato aldolase	ACA1_296270	6,32275	4,8	19,2	43,165
1219	Proteína hipotética	ACA1_097160	5,5538	5,19	17,70	19,367
1274	Isochorismatase hidrolase	ACA1_384860	5,3865	5,27	19,33	20,003
1315	Fator de iniciação eucariótica 5A	ACA1_023810	4,1066	4,84	15,83	16,798
1317	Proteína hipotética	ACA1_069360	4,31576	4,46	15,4	18,965
1318	Desoxirribose fosfato aldolase	ACA1_296270	4,92651	4,8	16,17	43,165
1326	3hidroxibutirato desidrogenase	ACA1_064580	6,52428	6,73	23,6	31,353
1334	Proteína hipotética (fragmento)	ACA1_125390	4,7444	6,8	14,50	18,02
1370	Proteína hipotética	ACA1_180600	4,16921	4,5	12	14,420
1375	Proteína contendo domínio de calponina	ACA1_109720	3,9283	6,93	11,86	48,94
1384	Desoxirribose fosfato aldolase	ACA1_296270	4,12872	4,8	11,5	43,165
1401	Proteína contendo repetição de anquirina	ACA1_391670	5,45053	5,61	10,17	13,228
2102	Oxidoredutase, aldo/keto redutase, putativa	ACA1_050180	4,30847	6,05	25	34,38

ANEXO 3

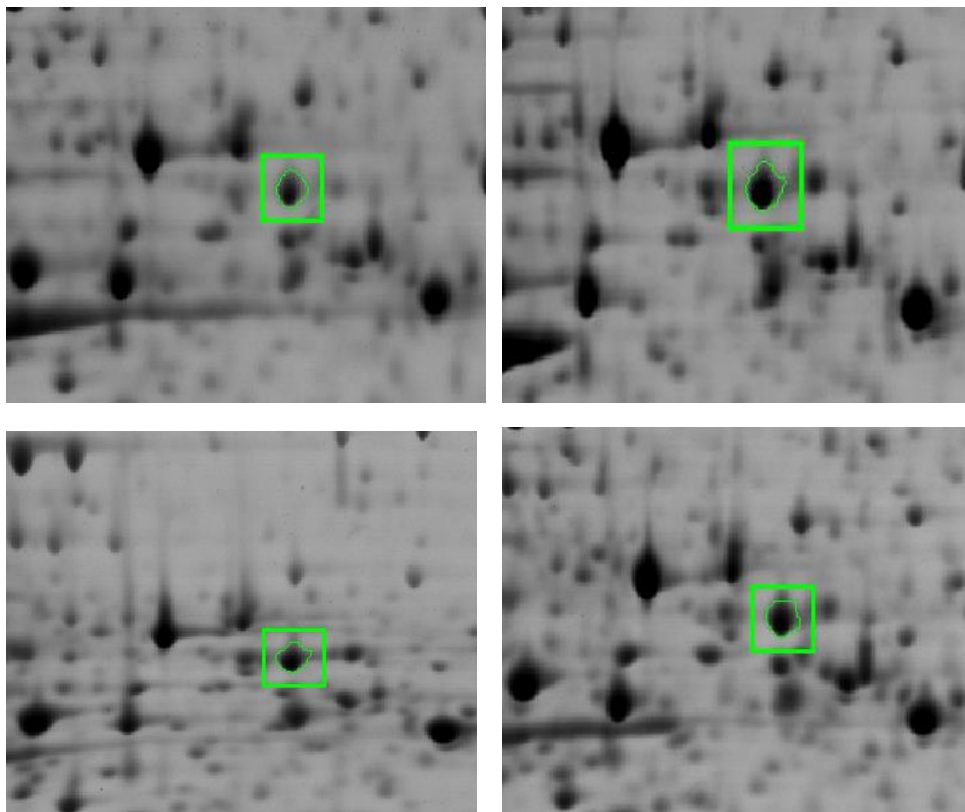
Spot 309 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



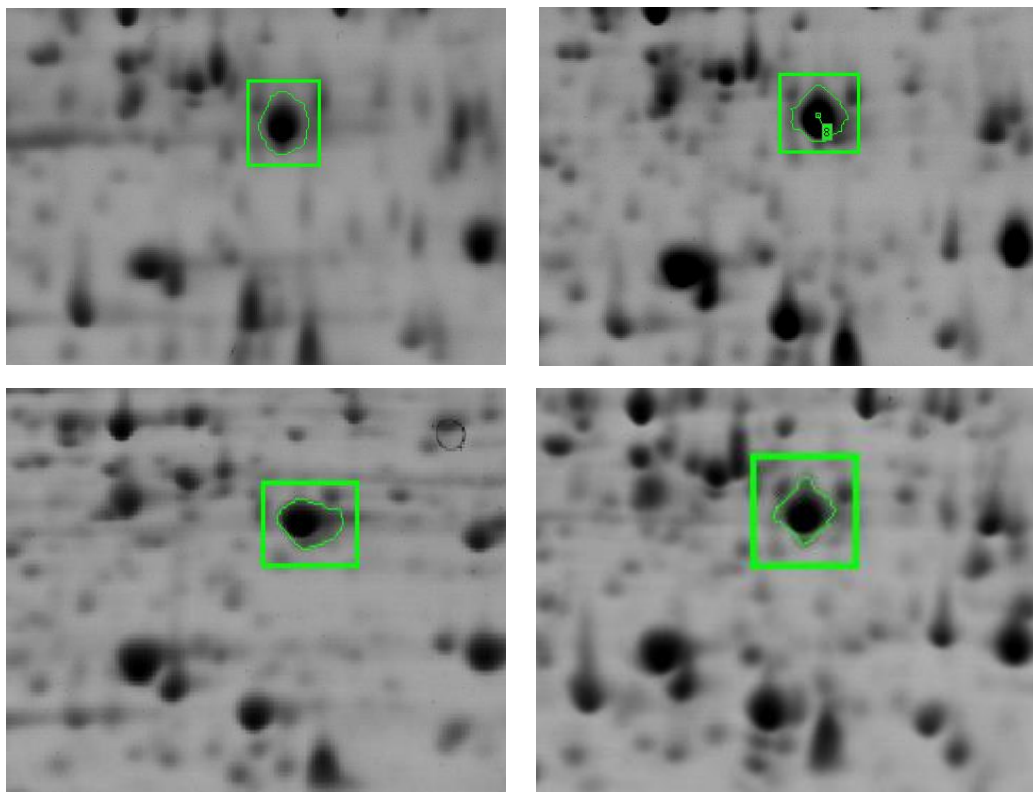
Spot 336 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



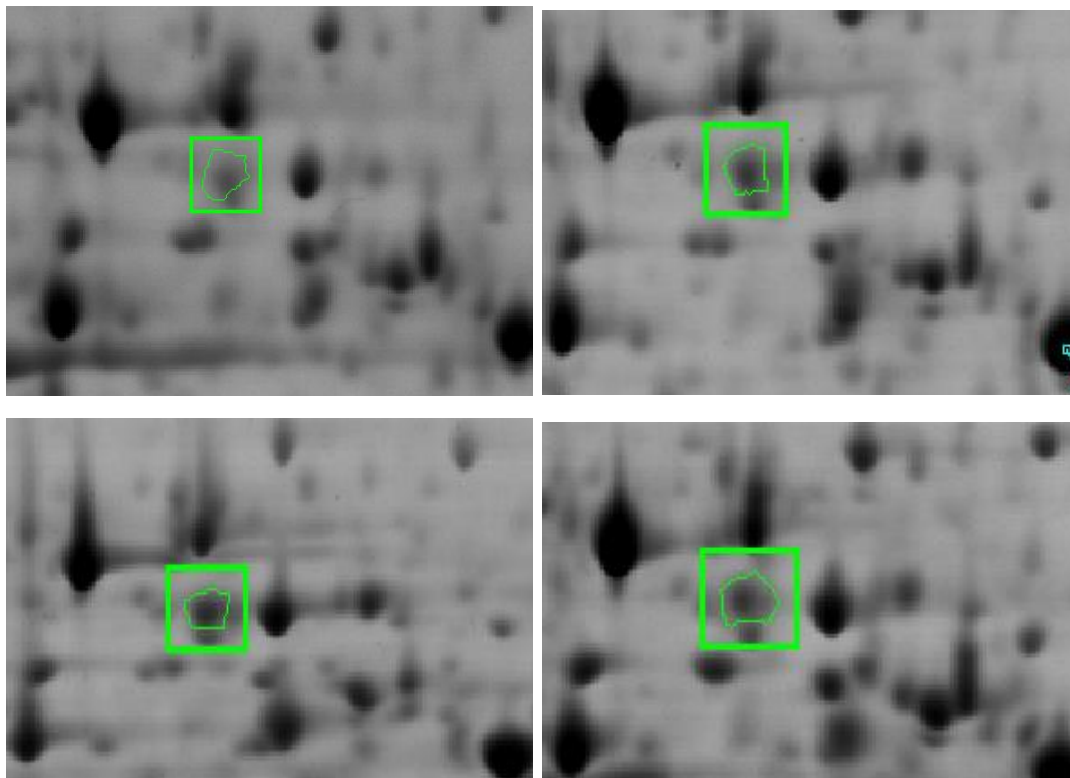
Spot 444 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



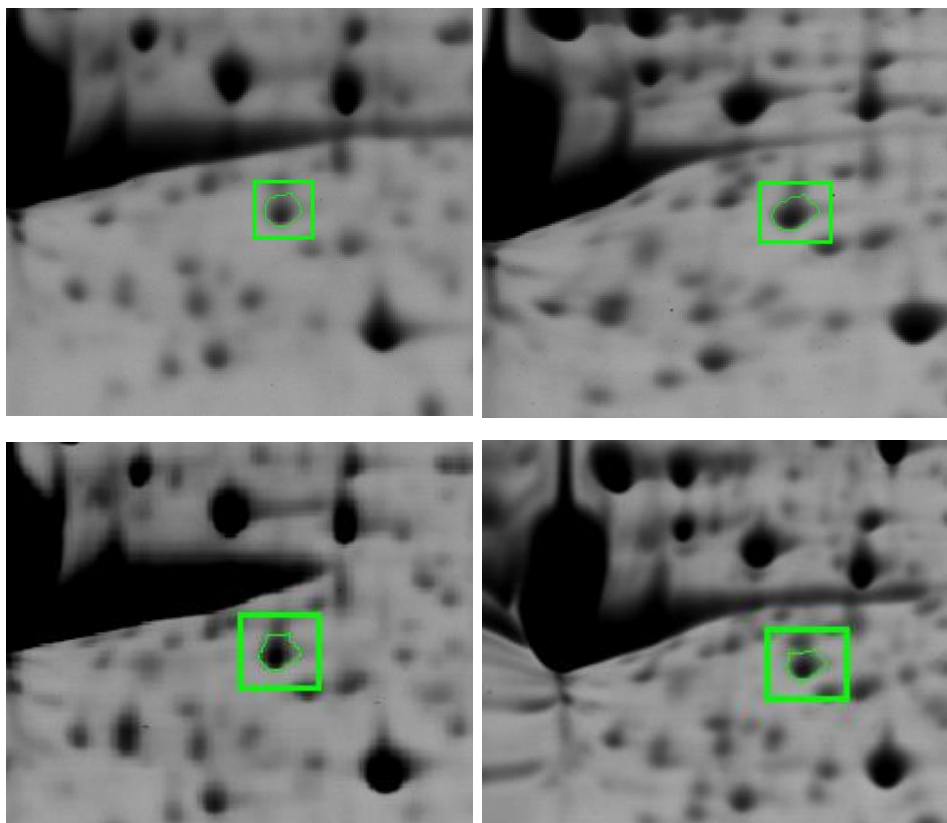
Spot 547 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



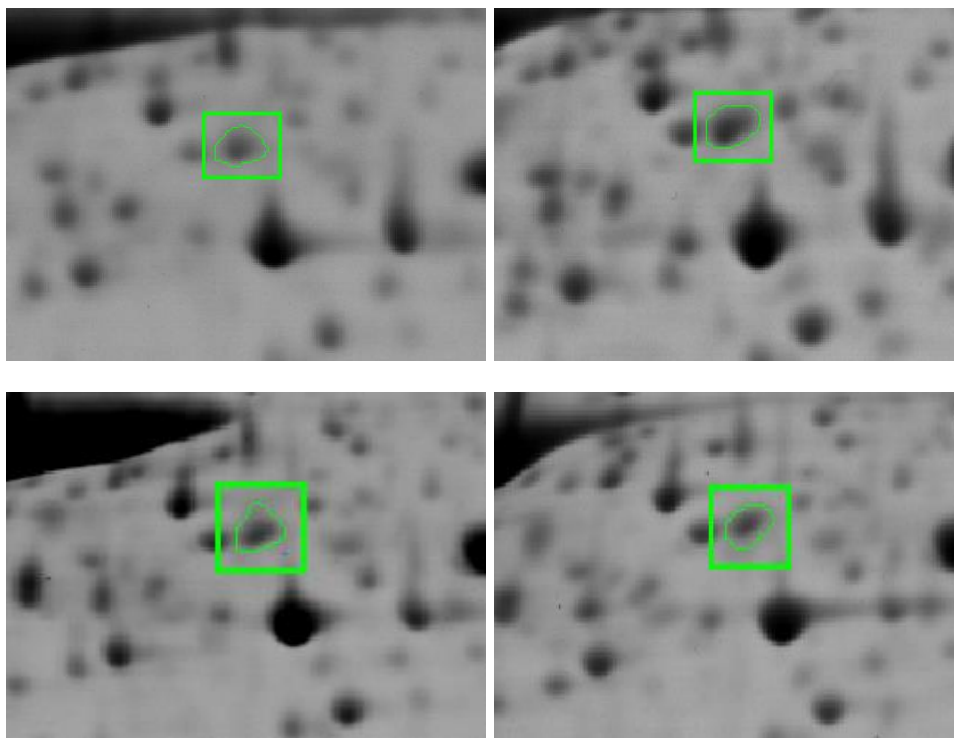
Spot 587 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



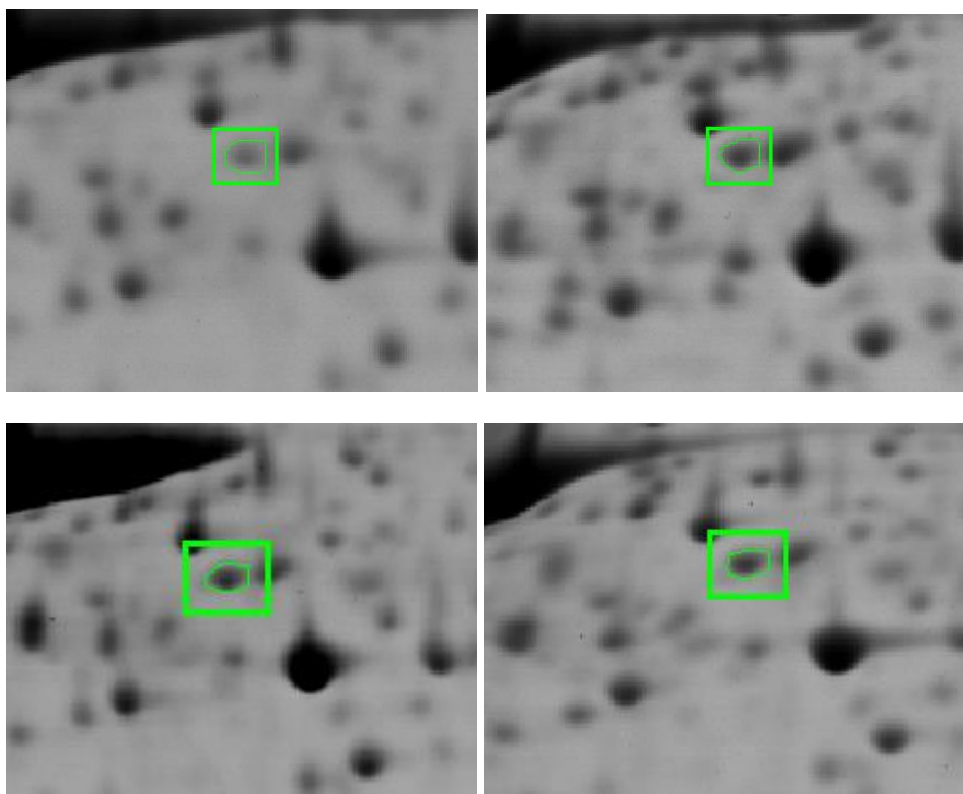
Spot 624 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



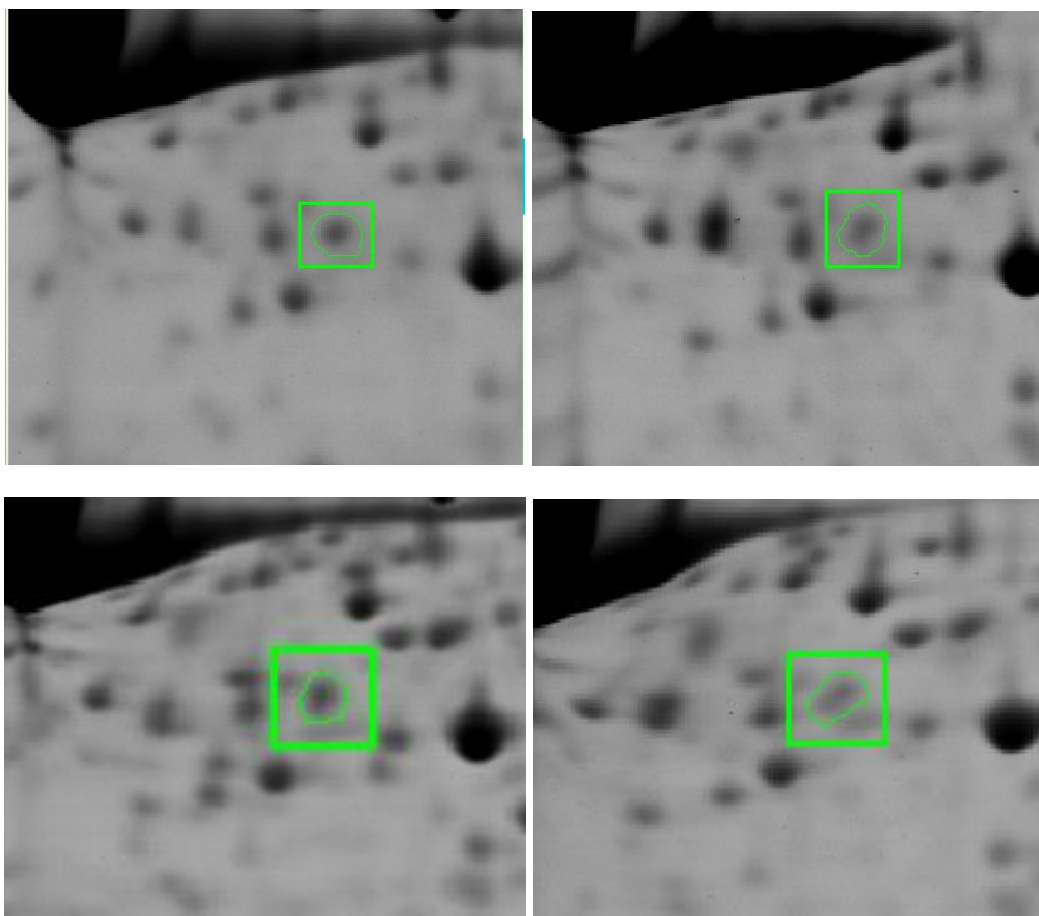
Spot 648 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



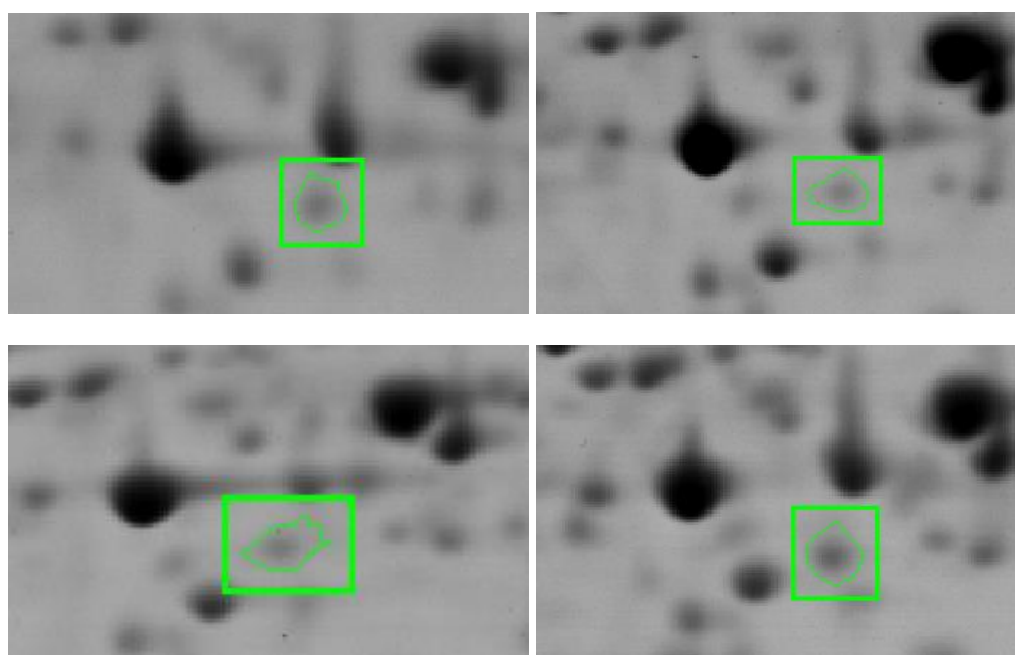
Spot 650 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



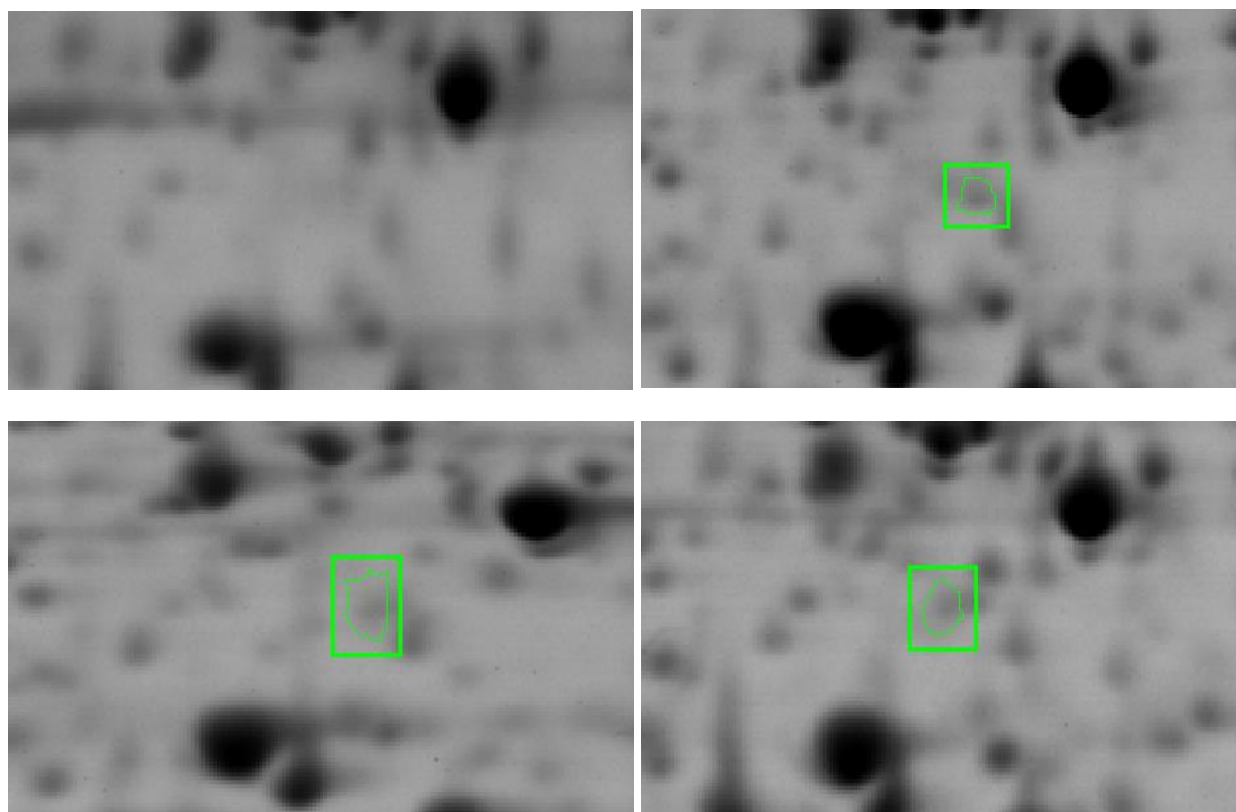
Spot 678 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



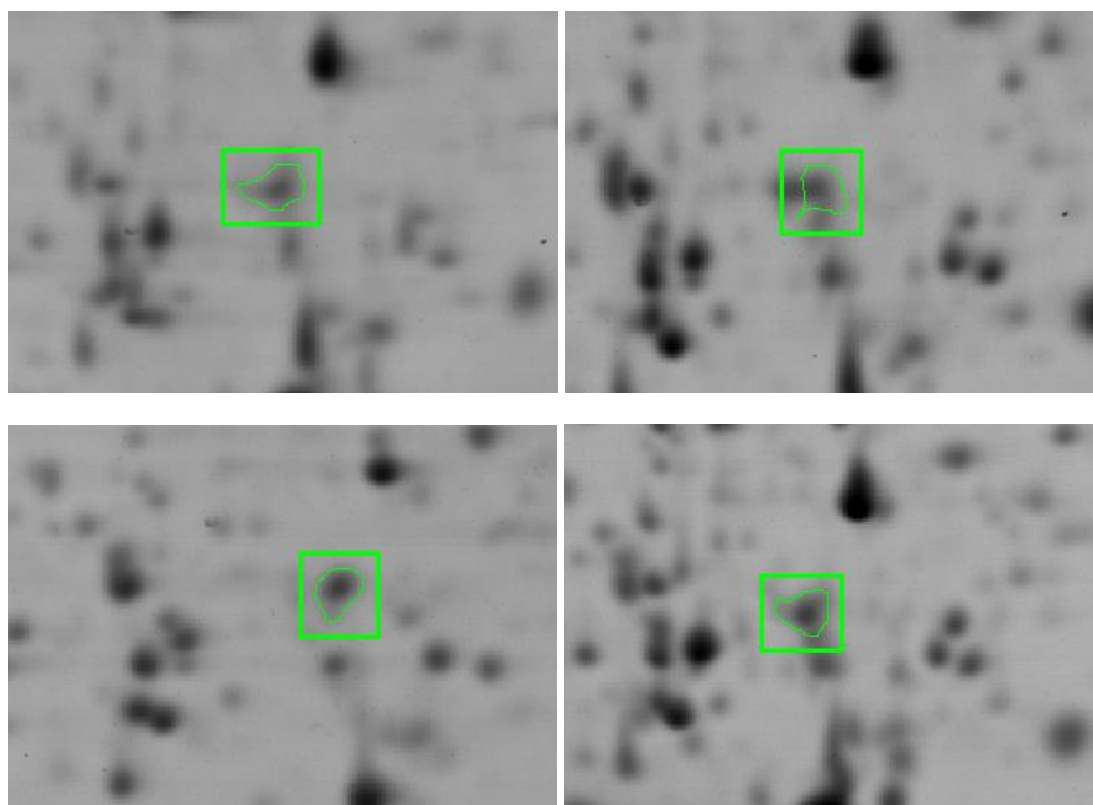
Spot 722 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



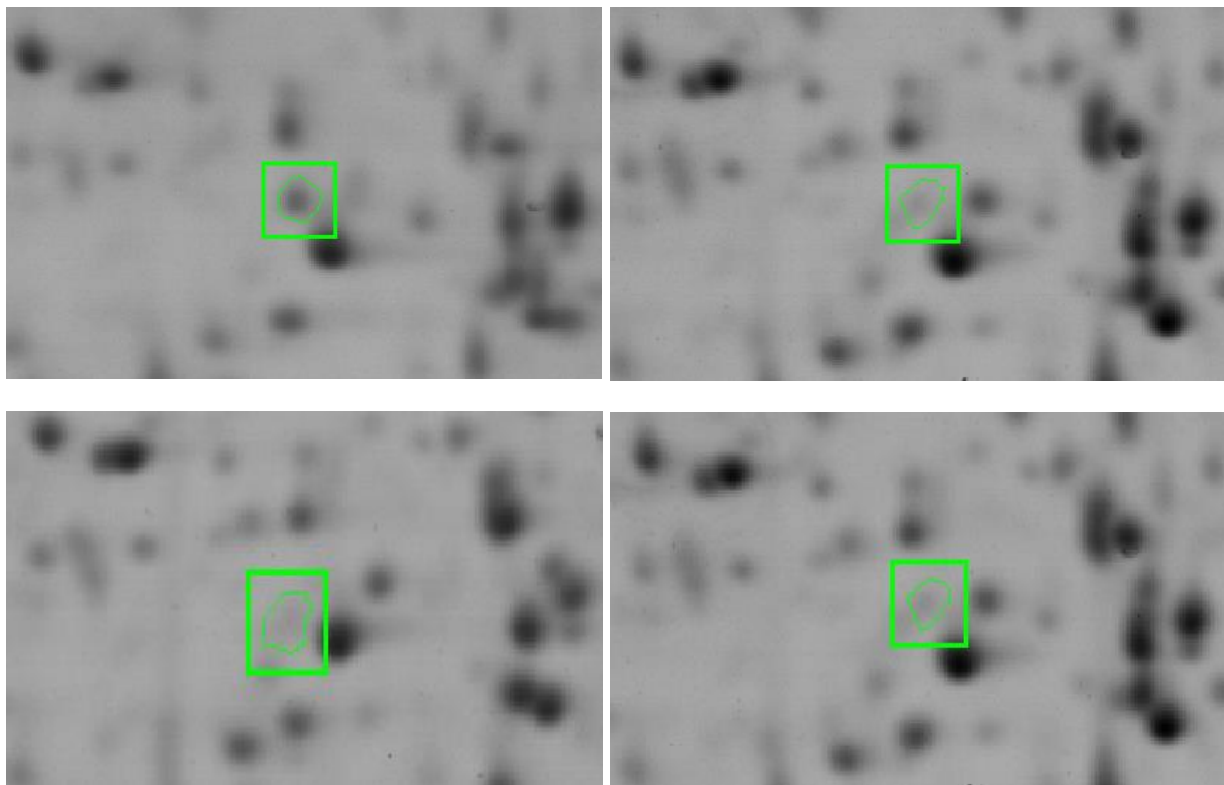
Spot 786 – Géis bidimensionais ALXItc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



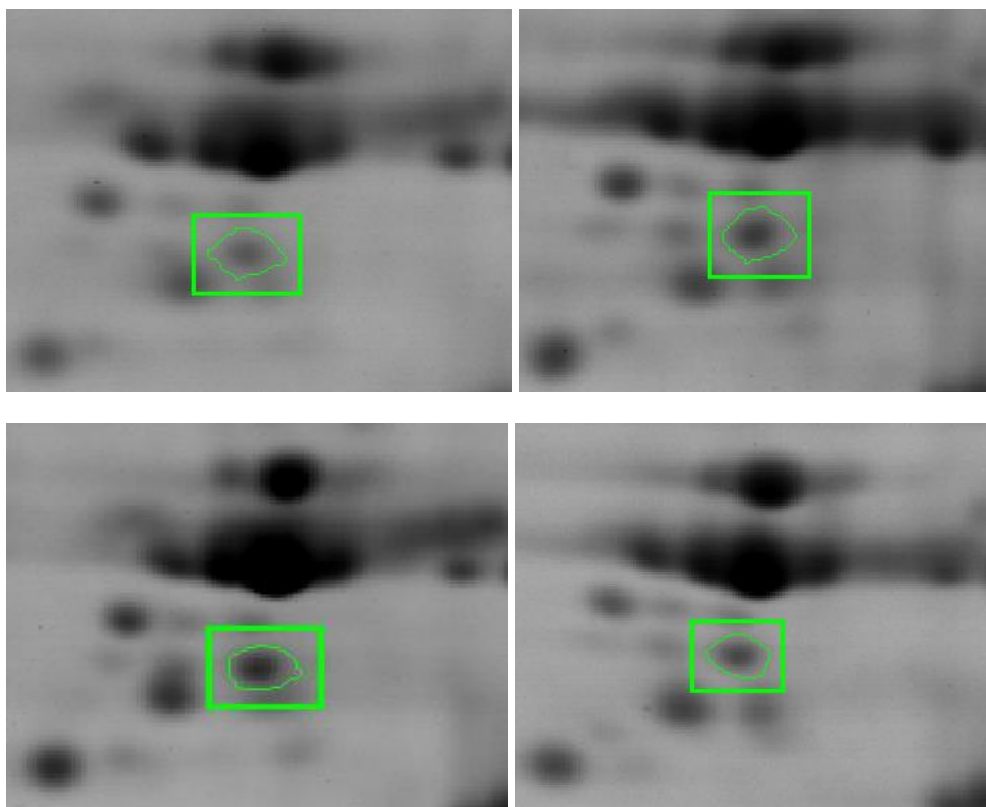
Spot 824 – Géis bidimensionais ALXItc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



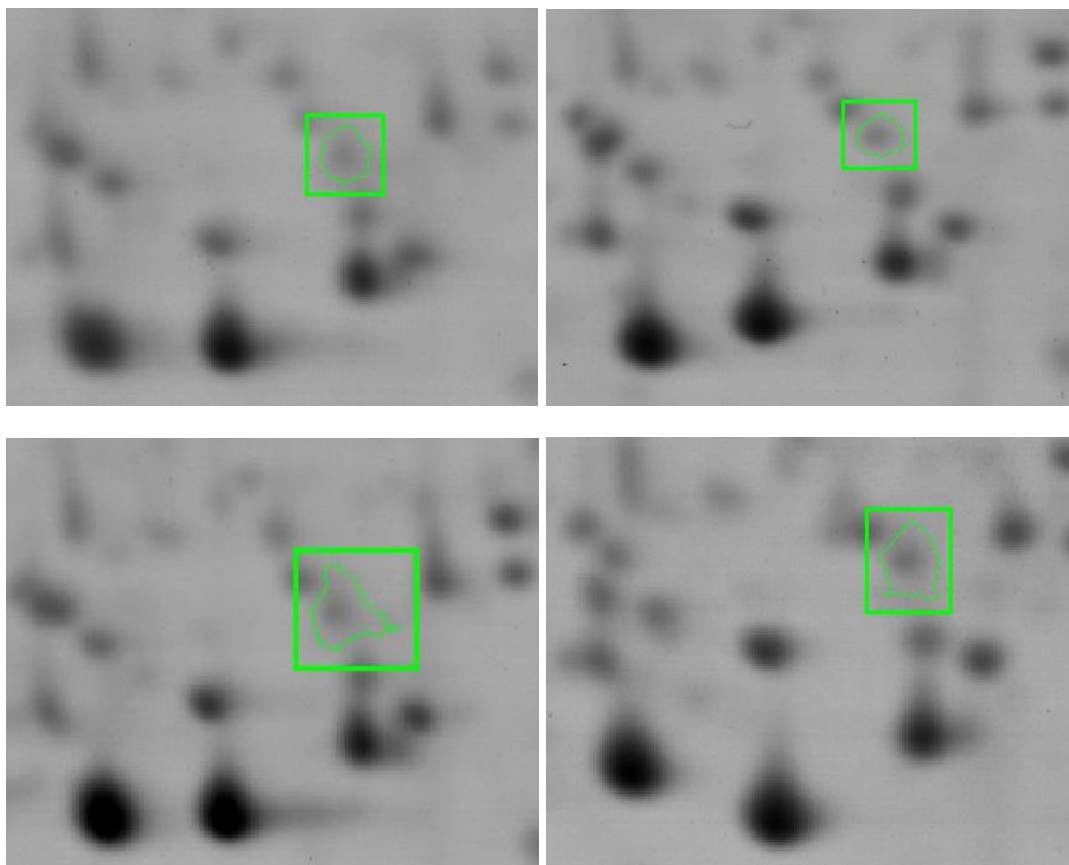
Spot 847 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



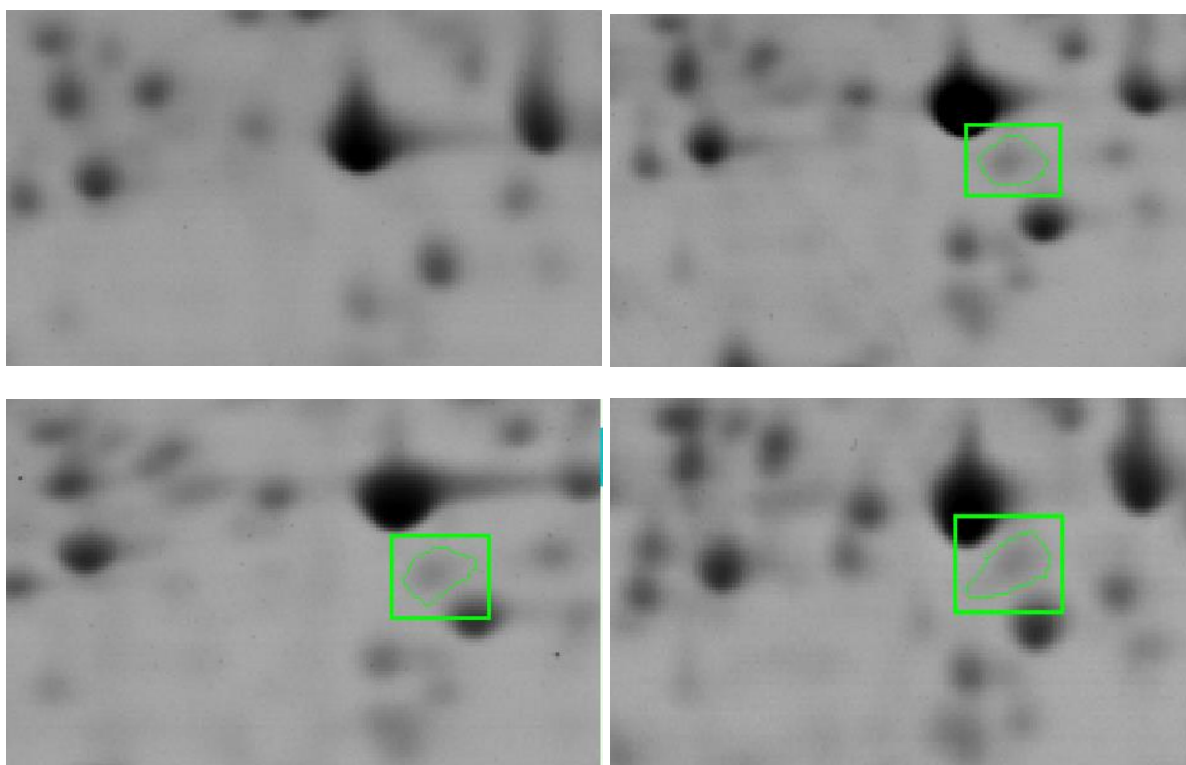
Spot 861 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



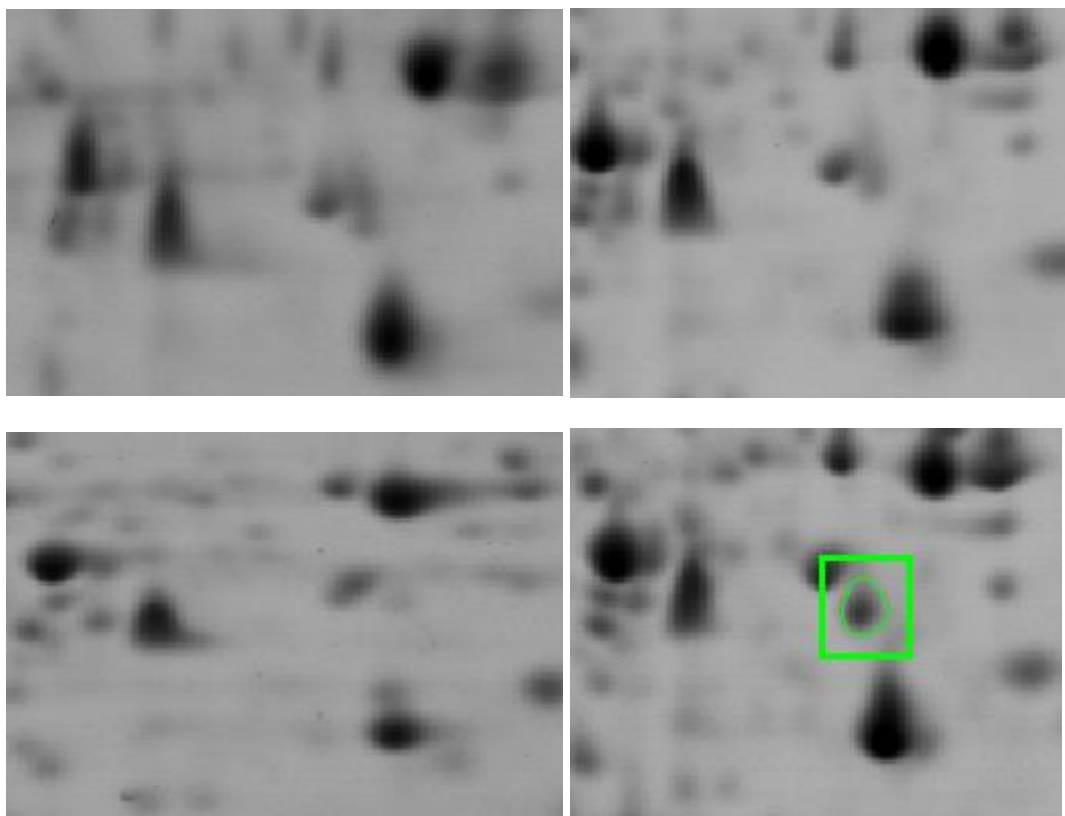
Spot 910 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



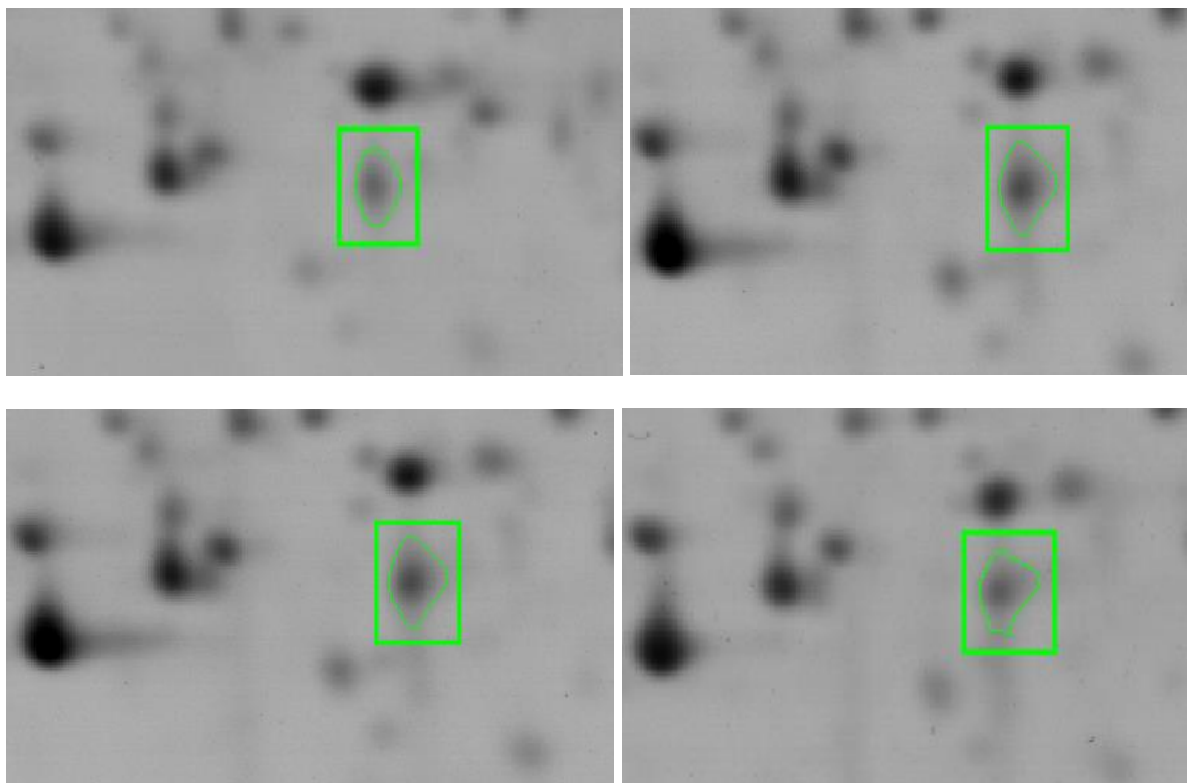
Spot 923 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



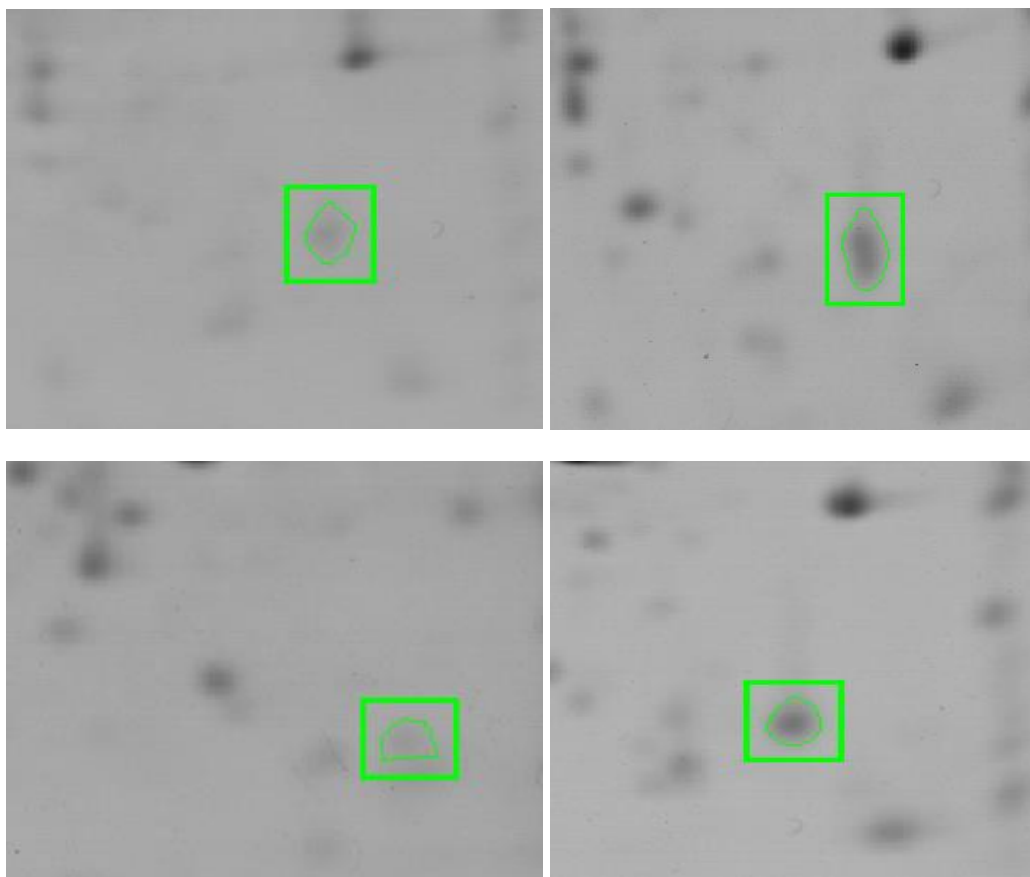
Spot 929 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



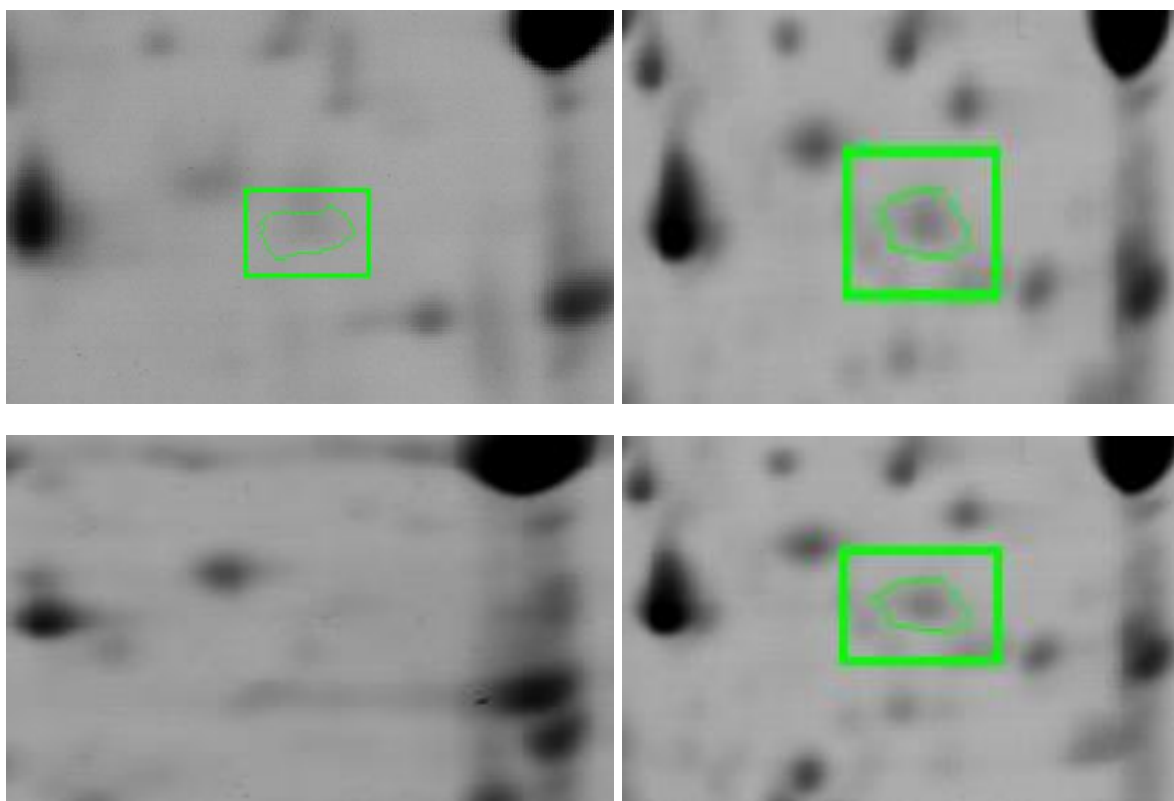
Spot 941 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



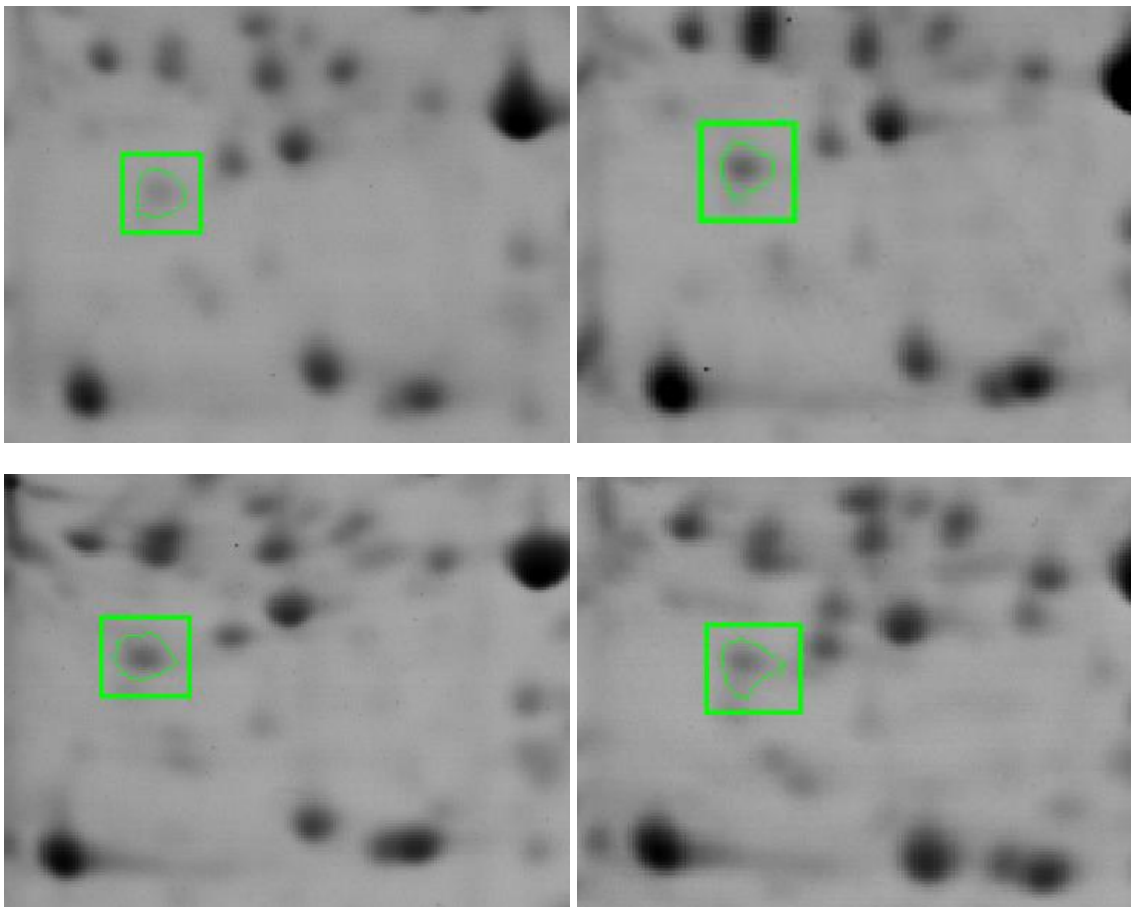
Spot 972 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



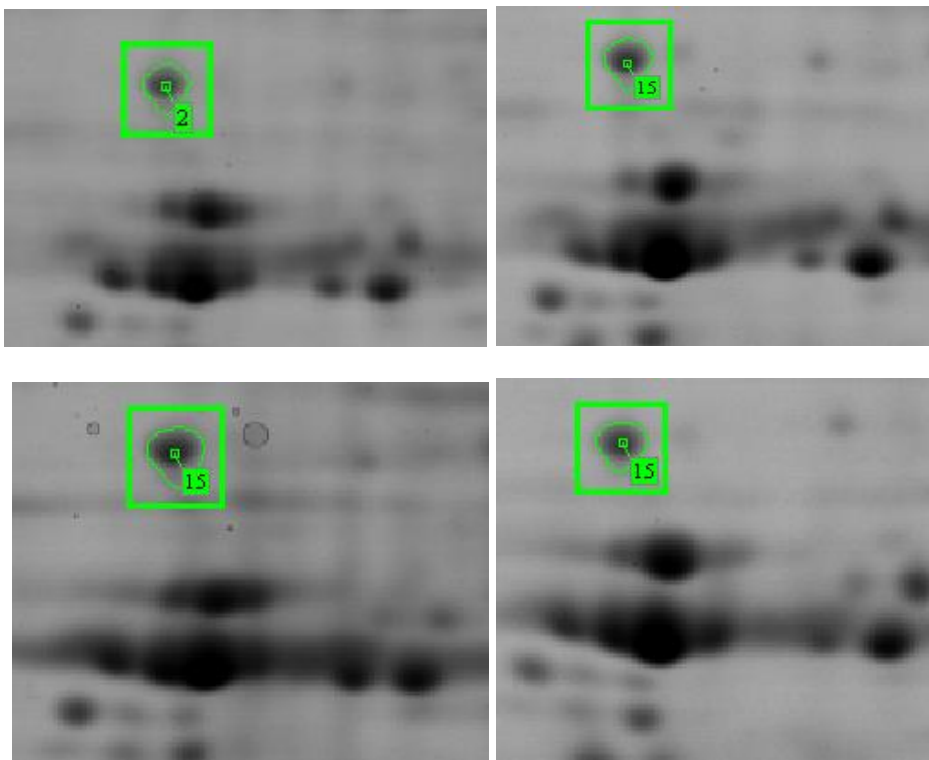
Spot 981 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



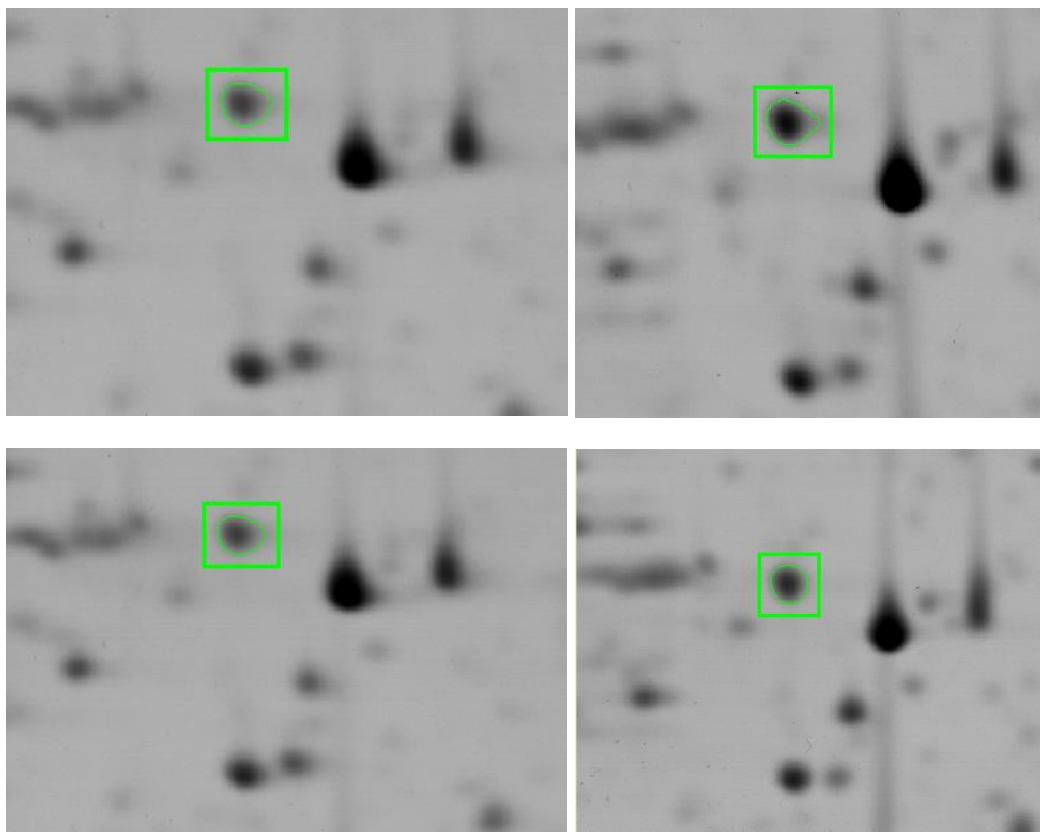
Spot 982 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



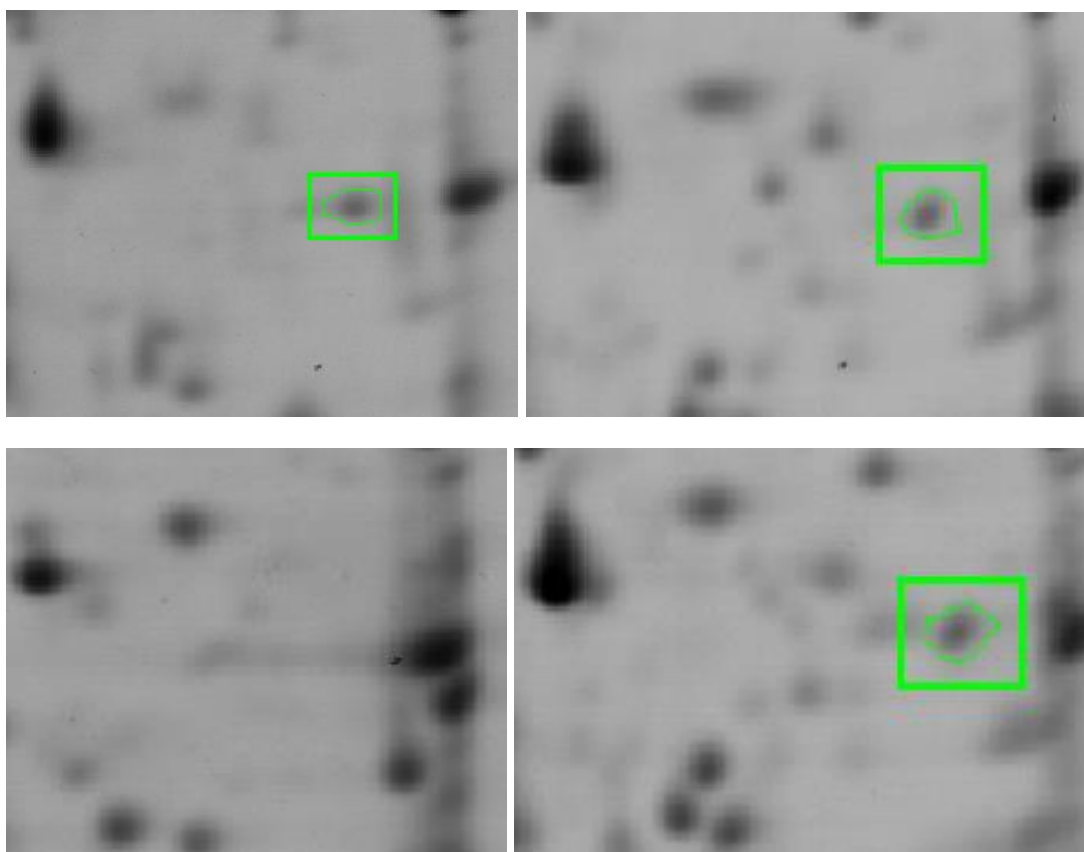
Spot 987 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



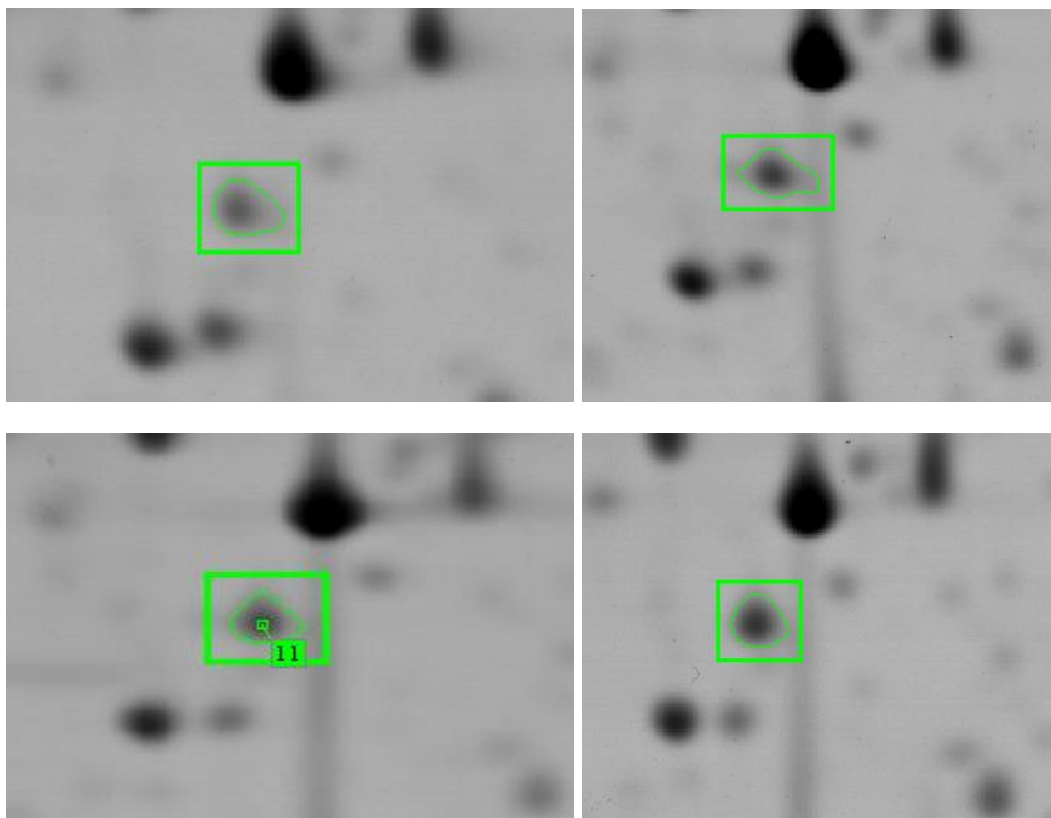
Spot 997 – Géis bidimensionais ALXItc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



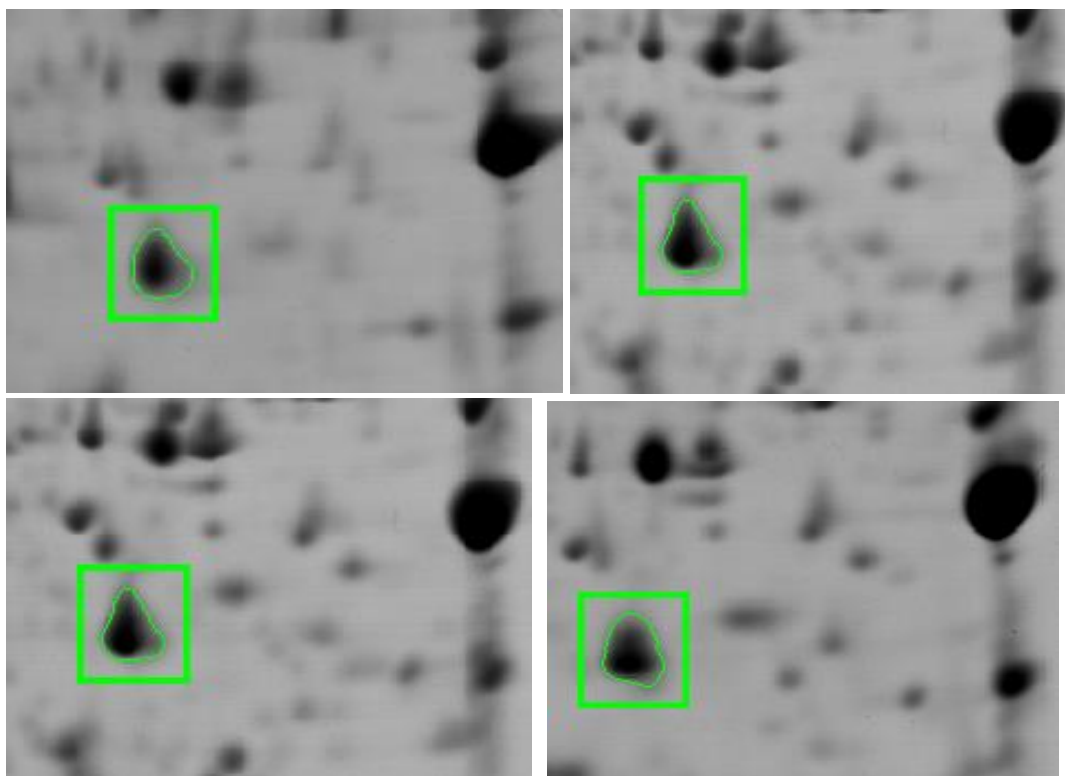
Spot 1010 – Géis bidimensionais ALXItc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



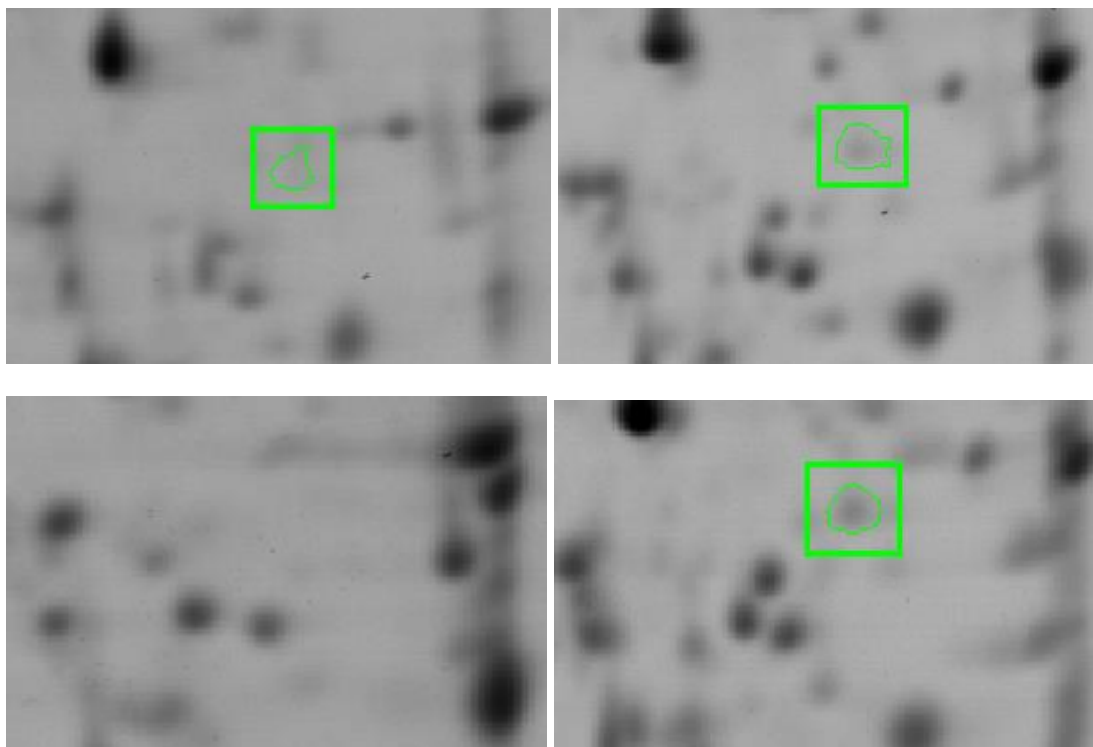
Spot 1021 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



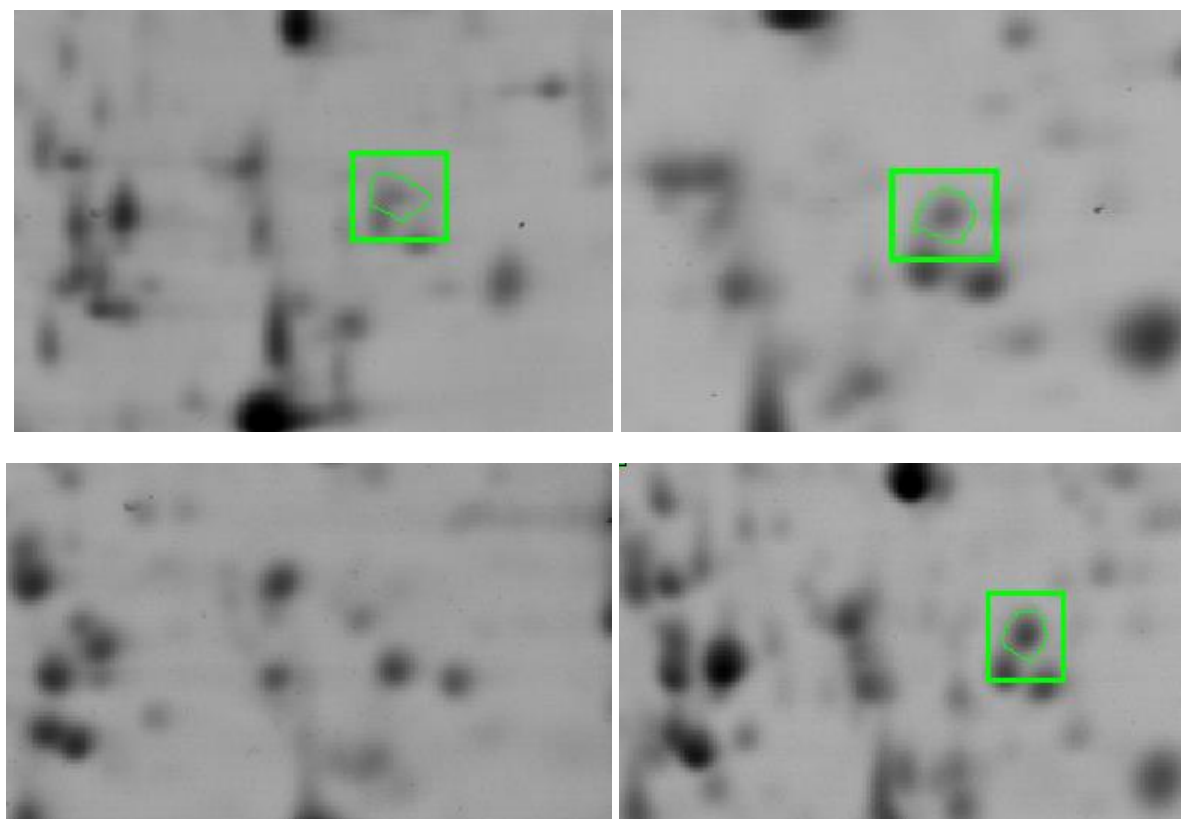
Spot 1026 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



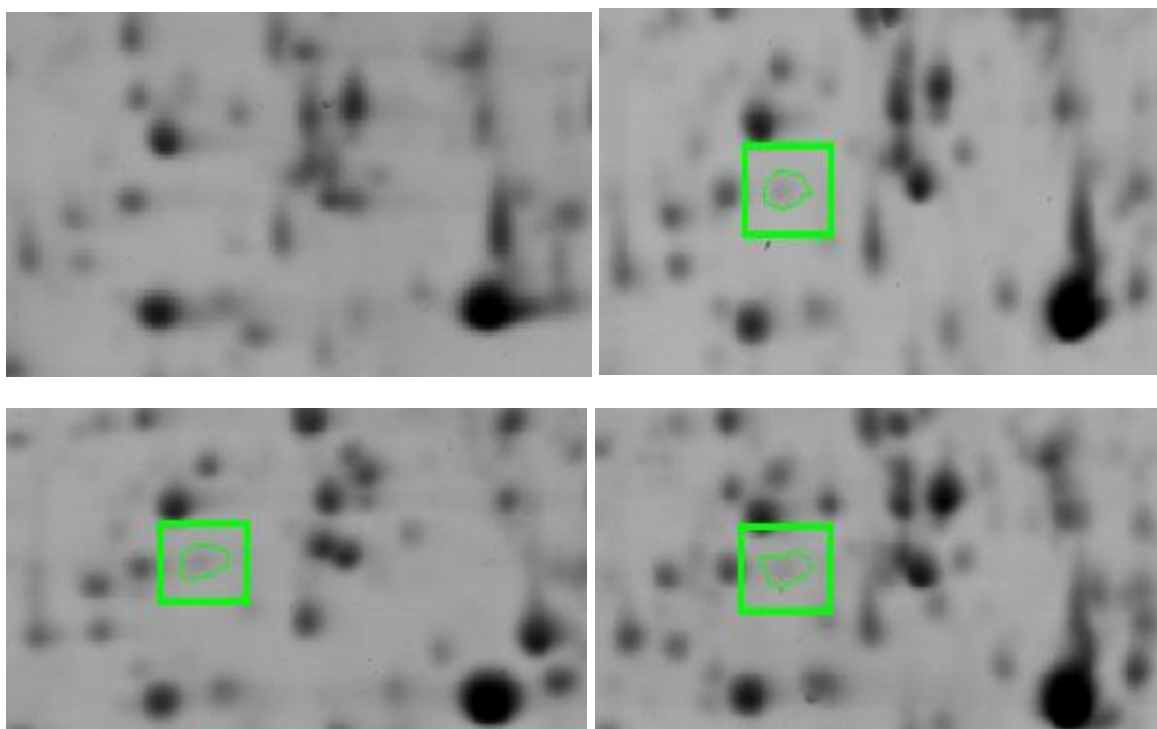
Spot 1037 – Géis bidimensionais ALXItc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



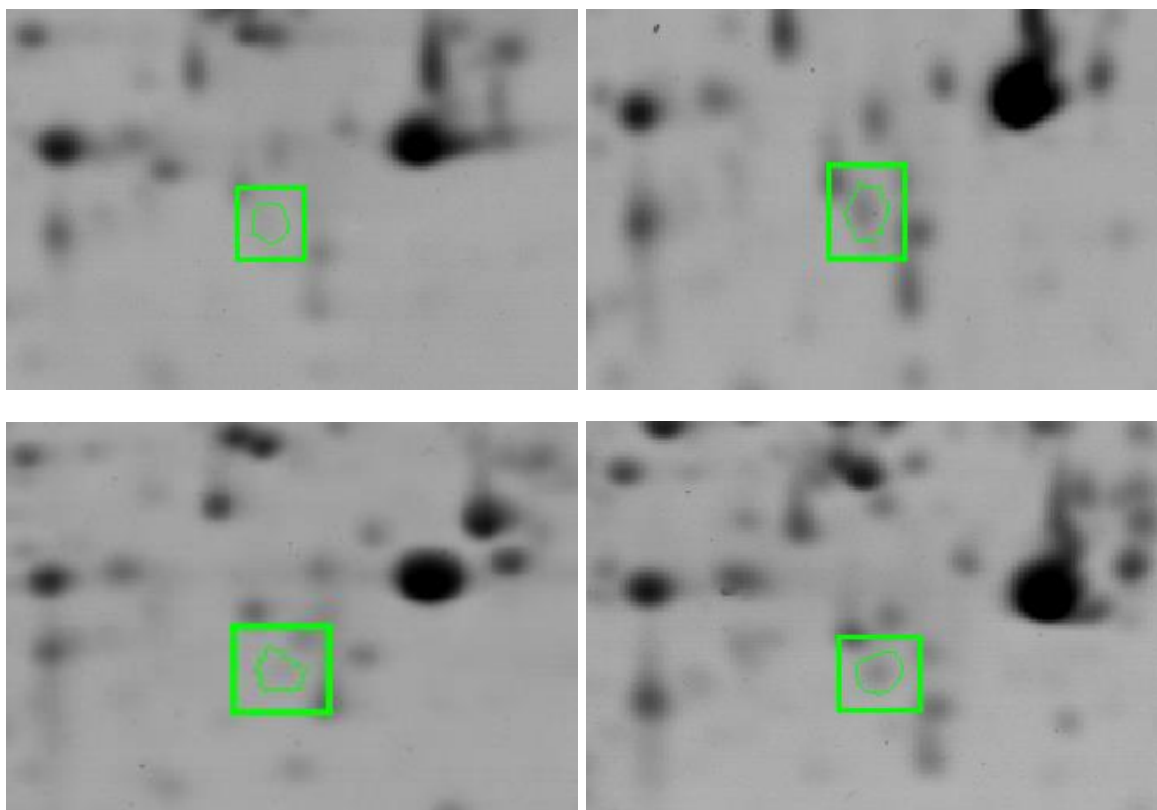
Spot 1074 – Géis bidimensionais ALXItc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



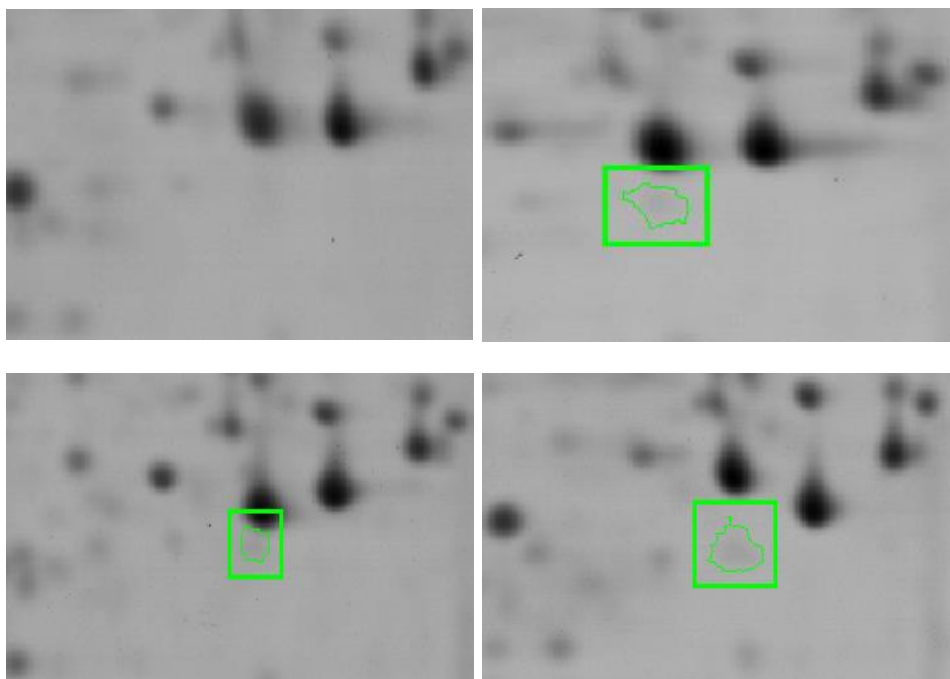
Spot 1196 – Géis bidimensionais ALXItc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



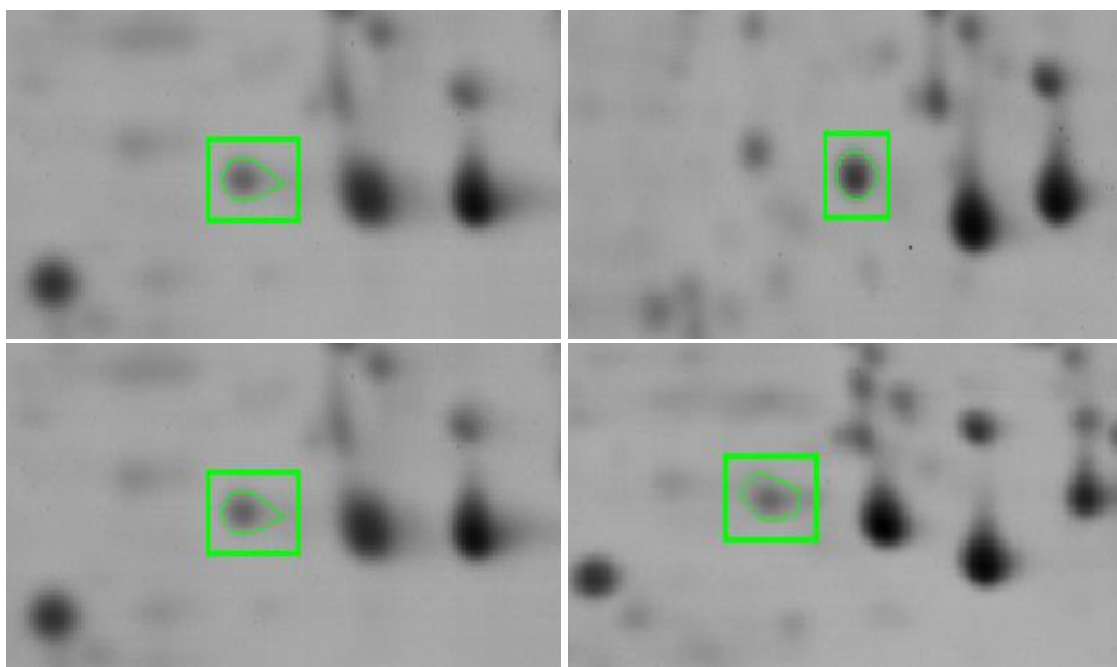
Spot 1197 – Géis bidimensionais ALXItc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



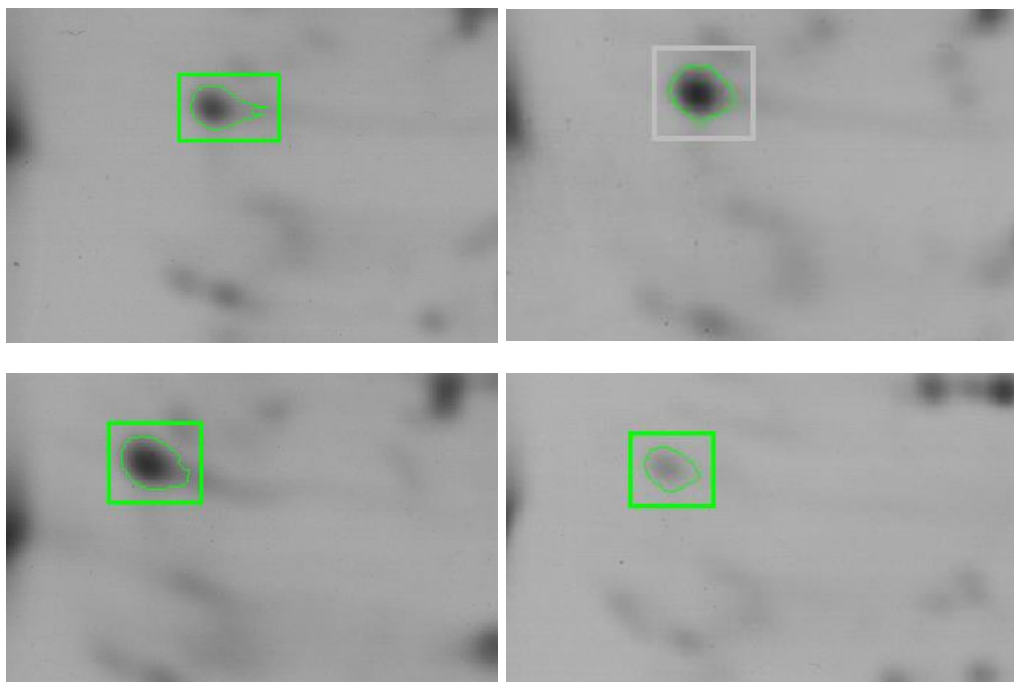
Spot 1219 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



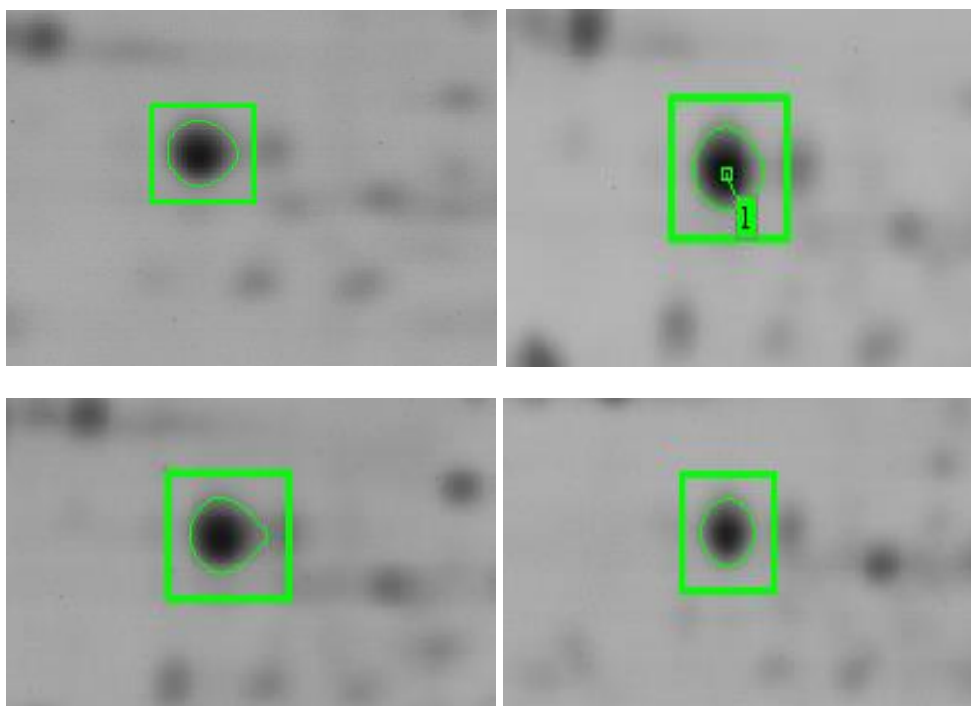
Spot 1274 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



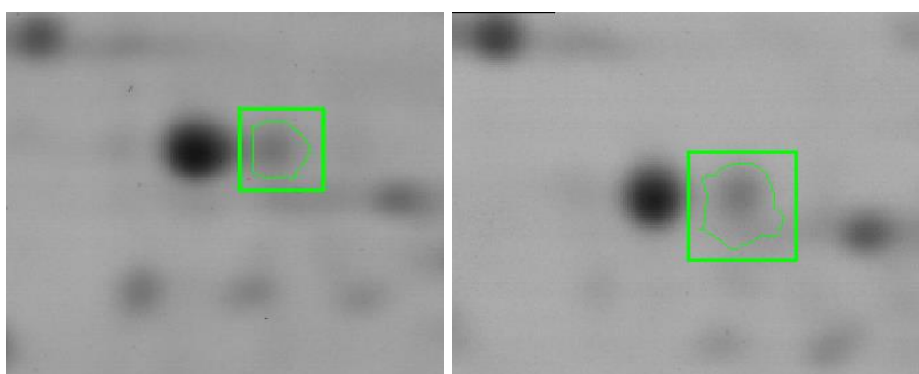
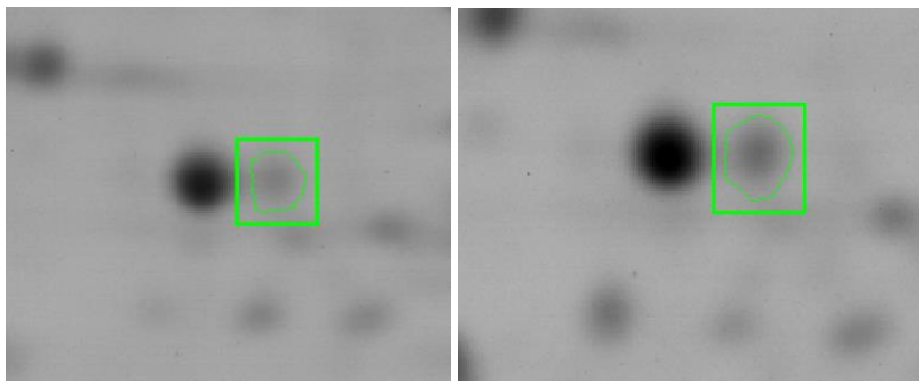
Spot 1315 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



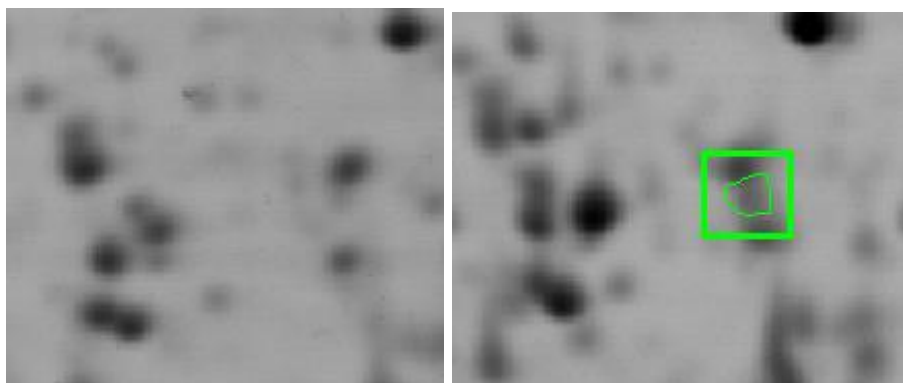
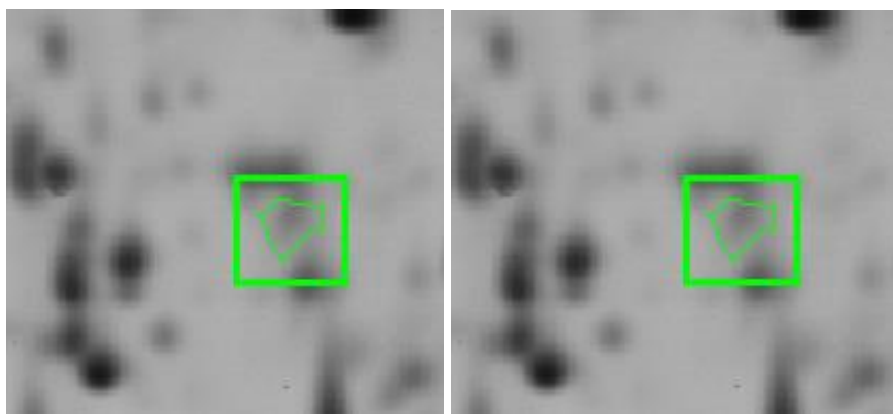
Spot 1317 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



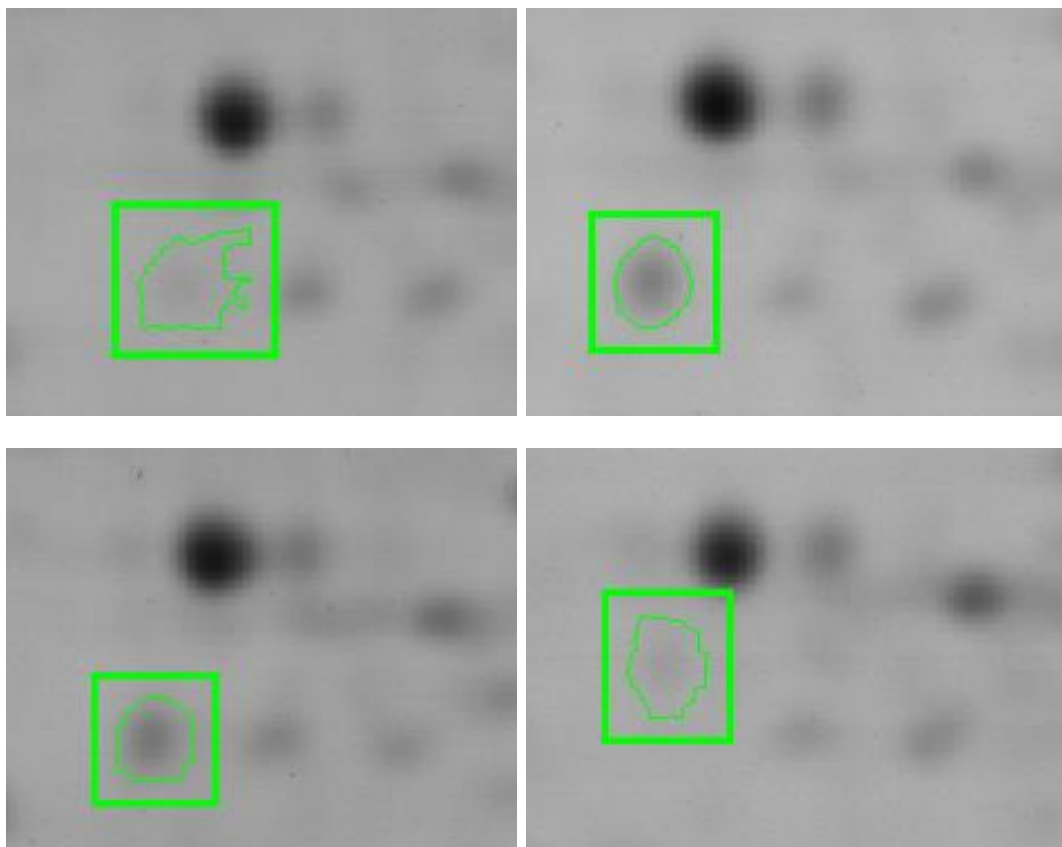
Spot 1318 – Géis bidimensionais ALXItc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



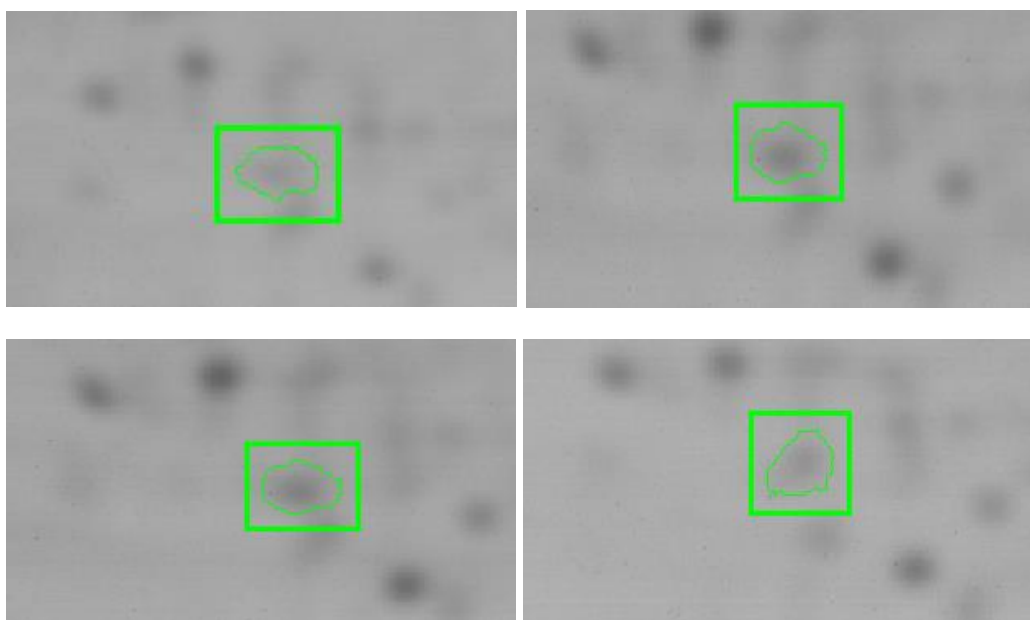
Spot 1326 – Géis bidimensionais ALXItc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



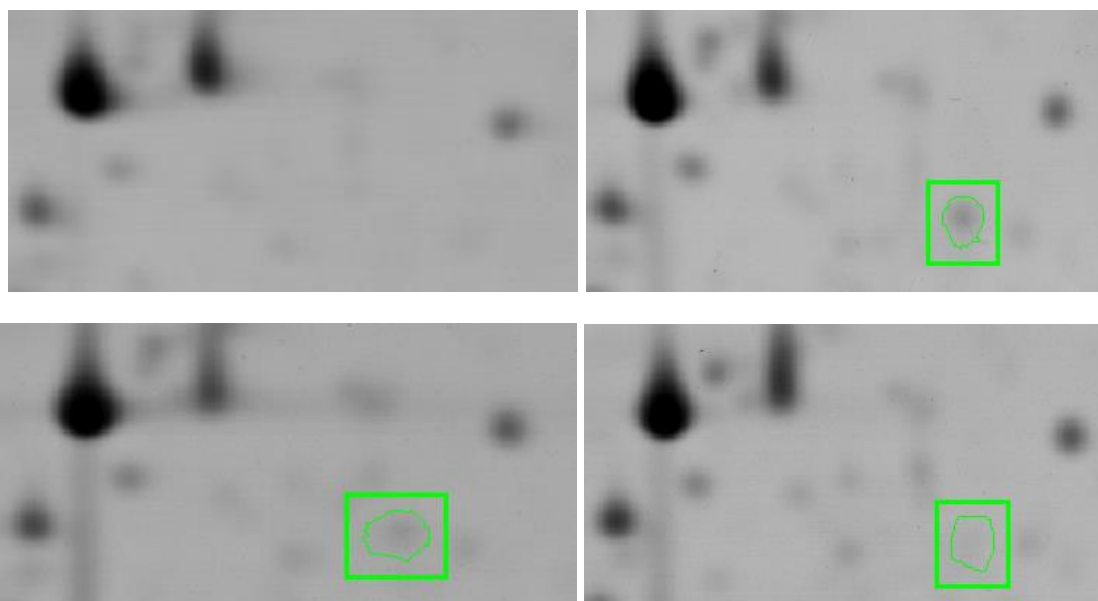
Spot 1334 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



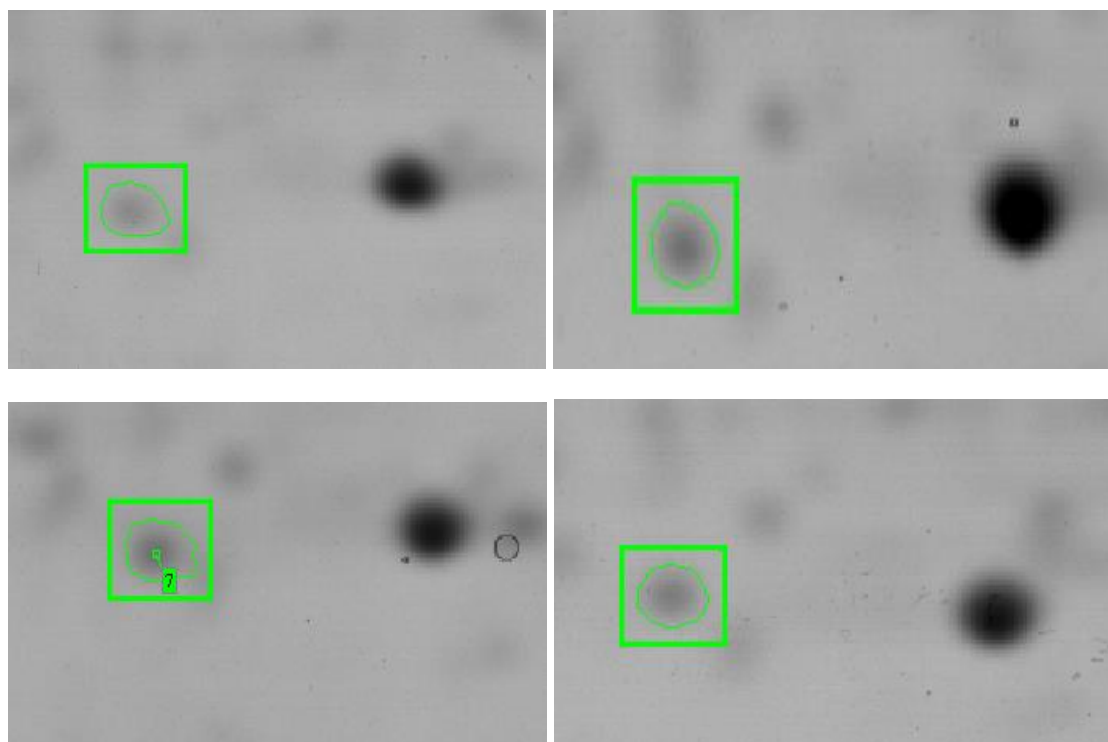
Spot 1370 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



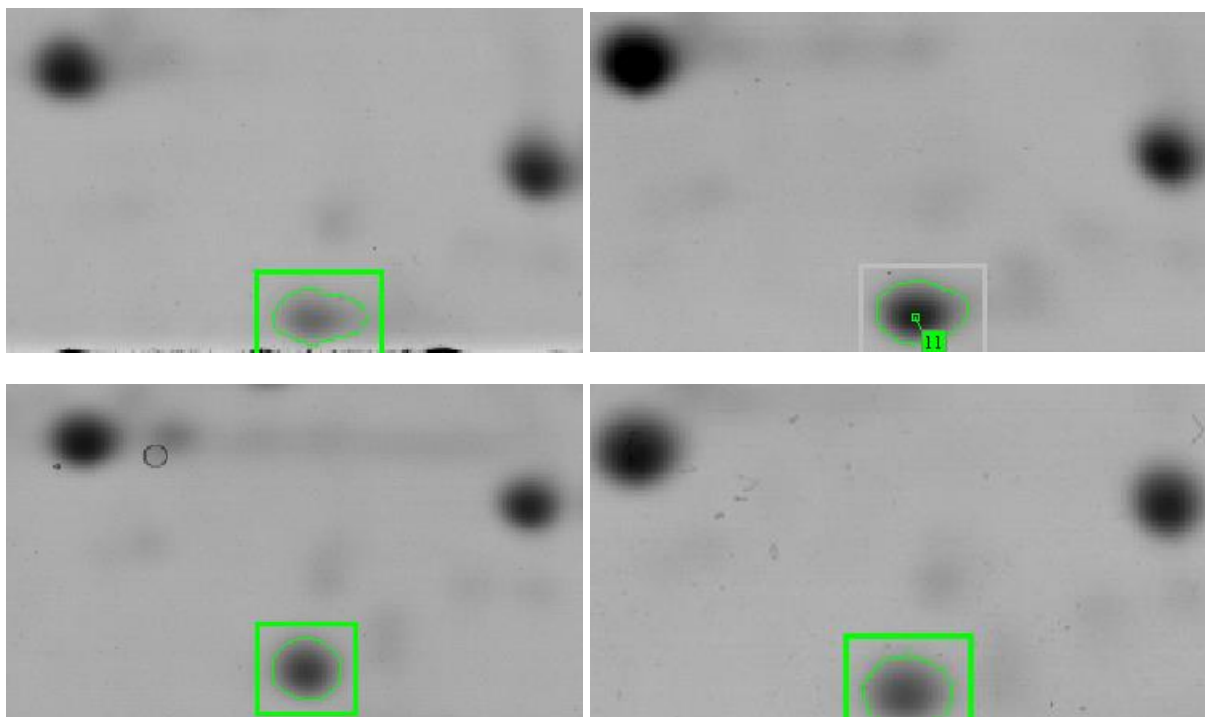
Spot 1375 – Géis bidimensionais ALXItc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



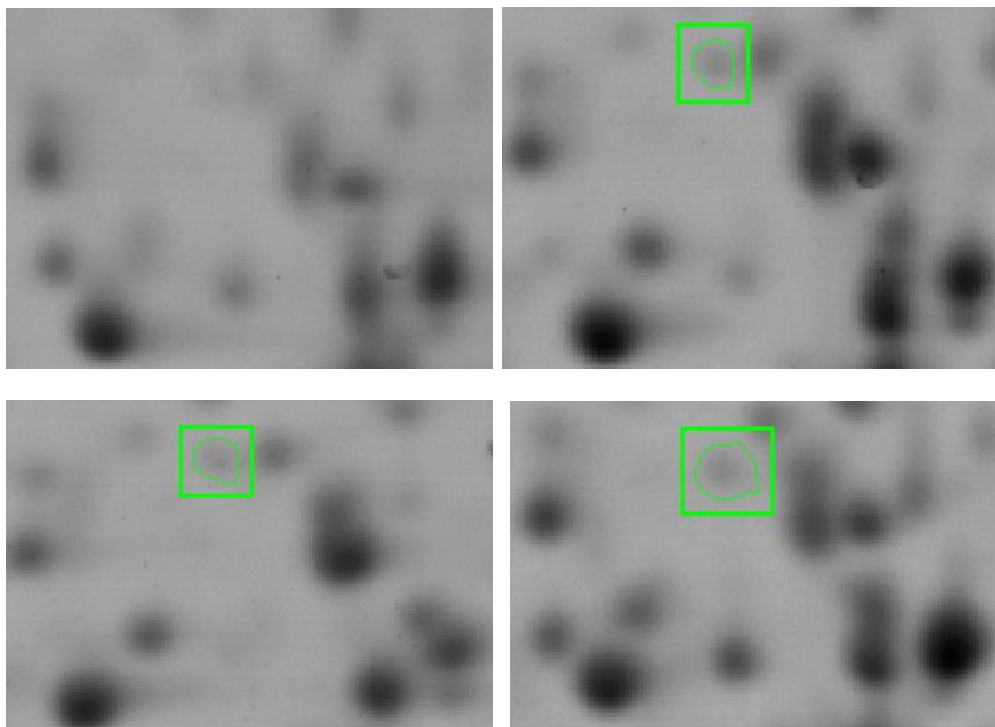
Spot 1384 – Géis bidimensionais ALXItc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



Spot 1401 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



Spot 2102 – Géis bidimensionais ALXltc, ALXrec1, ALXrec2, ALXrec3, respectivamente.



ANEXO 4

Tabela de função molecular e processos biológicos para as proteínas identificadas como diferencialmente expressas.

Gene	Proteína	GO função molecular	Descrição função molecular	GO processos biológicos	Descrição processo biológico
ACA1_023810	Fator de iniciação eucariótica 5A	GO:0043022	Ligação à ribossomo	GO:0045901	Regulação positiva da elongação traducional
		GO:0003746	Atividade do fator de alongamento da tradução	GO:0045905	Regulação positiva da terminação traducional
				GO:0006452	Mudança na janela de leitura traducional
ACA1_035360	Proteína de ligação à Actina	GO:0003779	Ligação à Actina	nula	
ACA1_048530	Superóxido dismutase [Cu-Zn]	GO:0046872	Ligação ao íon metal	GO:0055114 GO:0006801	Processo de oxirredução Processo metabólico superóxido
ACA1_050180	Oxidoreductase, aldo/keto reductase, putativa	GO:0016491	Atividade oxirreductase	GO:0055114	Processo de oxirredução
ACA1_058810	Inositol 3-fosfato sintase	GO:0004512	Atividade de inositol-3-fosfato sintase	GO:0006021 GO:0008654	Processo biosintético de inositol Fosfolípide Processo de biossíntese
ACA1_061790	Tiamina fosfato pirofosforilase	GO:0004417 GO:0004789	Hidroxietiltiazole Atividade de quinase, Atividade de tiamina fosfato difosforilase	GO:0009228	Processo biosintético de tiamina

ACA1_073080	Complexo regulatório 26S proteassomo subunidade RPN11	GO:0005515	Ligação à proteína	nula	
ACA1_080550	Proteína contendo domínio de ligação à FAD	GO:0010181 GO:0016491	Ligação ao mononucleotídeo Flavina (FMN) Atividade de oxirredutase	GO:0055114	Processo de oxirredução
ACA1_091670	ATP:L-metionina	GO:0005524	Ligação ao ATP	GO:0006556	S-adenosilmetionina
	S-Adenosiltransferase	GO:0004478	Atividade de metionina adenosiltransferase		Processo de biossíntese
ACA1_097160	Proteína hipotética	nula		nula	
ACA1_109720	Proteína contendo domínio de calponina	GO:0005515	Ligação à proteína	nula	
ACA1_154210	BadF/BadG/BcrA/BcrD ATPase proteína de superfamília	nula		nula	
ACA1_174240	Rho guanina fator de dissociação isoforma 2, putativa	GO:0005094	Atividade inibitória de dissociação Rho GDP	nula	
ACA1_198360	Proteína epitioespecificadora	GO:0005515	Ligação à proteína	nula	
ACA1_199990	Subunidade de proteína beta de	GO:0005515	Ligação à proteína	nula	

	Ligação a nucleotídeos guanina, putativa				
ACA1_201650	Proteína RAD51, reparo do DNA, putativa	GO:0005524 GO:0008094 GO:0000150	Ligação à proteína, Atividade de ATPse DNA dependente Atividade de recombinase	GO:0000724 GO:1990426	Reparo na quebra de dupla fita Recombinação homologa por homologia
		GO:0003697	Ligação ao DNA fita simples		Processamento da forquilha de replicação dependente de recombinação
		GO:0003690	Ligação ao DNA fita dupla		
ACA1_245960	Proteína hipotética	nula		nula	
ACA1_264380	S-formilglutaciona hidrolase	GO:0018738	Atividade de hidrolase s-formilglutaciona	GO:0046294	Processo catabólico de formaldeído
ACA1_296270	Desoxirribose fosfato aldolase	GO:0005509 GO:0004139	Ligação ao íon cálcio Atividade aldolase desoxirribose fosfato	GO:0009264	Processo catabólico de desoxirribonucleotídeo
ACA1_310610	Sacaropina desidrogenase	GO:0016491	Atividade de oxirredutase	GO:0055114	Processo de oxirredução
ACA1_314990	Oxidoredutase da família de desidrogenases de ligação ao zinco	GO:0016491	Atividade de oxirredutase	GO:0055114	Processo de oxirredução
ACA1_368860	Proteína contendo domínio	nula		GO:0006950	Resposta ao estresse

universal de estresse

ACA1_378160	Ubiquitina carboxi-terminal hidrolase	GO:0004843	Atividade de protease específica de ubiquitina dependente de tiol	GO:0006511	Processo catabólico de proteína dependente de ubiquitina
ACA1_382620	Proteína de superfamília Serpina (inibidor de serino proteinase)	nula		nula	
ACA1_384630	Desidrogenase acilCoA específica de cadeia curta/ ramificada, mitocondrial, putativa	GO:0003995 GO:0050660	Atividade de acil-CoA desidrogenase Ligação de dinucleotídeo de flavina adenina	GO:0055114	Processo de oxirredução
ACA1_384860	Isochorismatase hidrolase	GO:0003824	Atividade catalítica	GO:0008152	Processo metabólico
ACA1_391670	Proteína contendo repetição de anquirina	GO:0005515	Ligação à proteína	nula	
ACA1_399750	Carboxipeptidase A1, putativa	GO:0004181 GO:0008270	Atividade metalocarboxipeptidase Ligação ao íon zinco	GO:0006508	Proteólise
