

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

NORBERTO DE SOUZA FERNANDES

**PATOGENICIDADE DE TRÊS GRUPOS DE *Acanthamoeba* PERTENCENTES A
GENÓTIPOS DISTINTOS: AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Belo Horizonte

2019

NORBERTO DE SOUZA FERNANDES

**PATOGENICIDADE DE TRÊS GRUPOS DE *Acanthamoeba* PERTENCENTES A
GENÓTIPOS DISTINTOS: AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Adriana Oliveira Costa - UFMG.

Coorientador: Prof.^o. Dr. Marcelo Vidigal Caliari - UFMG.

Belo Horizonte

2019

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, o Nosso grandioso Senhor do mundo com todo louvor por tornar esse trabalho possível.

Aos meus orientadores Prof^a. Dr^a. Adriana de Oliveira Costa, Prof^o. Dr. Marcelo Vidigal Caliari pela supervisão, tempo, paciência e enorme apoio durante o meu mestrado.

À coordenação da pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia UFMG.

Aos Prof. Vicente Toledo, Prof. Calos Tagliati, Prof^a.Tânia Mara, Prof^a. Ana Paula Lucas e Prof^a. Ieda de Fátima, que fizeram mais do que apenas ensinar conceitos, me motivando e estimulando minha perseverança para que eu desenvolvesse ainda mais dom profissional.

Ao suporte técnico dedicado pelos meus amigos Alexandre B. C. Neto, Maria Adelaide Fernandes e pelo pós-doutorado Fabrício Marcus e doutorando Cesar Augusto.

Agradeço a Prof.^a Dr^a. Cinthia Furst por gentilmente me fornecer as amostras de linhagens para esse estudo.

Às minhas amigas Mardelene Geisa Gomes da Faculdade de Veterinária, Mirna Maciel, Fernanda de Fátima e Anna Cláudia Souza da Faculdade de Farmácia pela disponibilidade e presteza durante o desenvolvimento da minha dissertação.

Às amigas Cláudia Márcia e Cristiana Aparecida, pelo incentivo durante toda caminhada acadêmica e por todo apoio concedido a mim em todos os momentos.

Gostaria, ainda, de estender meu agradecimento aos meus colegas e amigos do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, bem como Vanda Madeira, Eunice Piedade, Isabela Aurora e Luciana Duarte do laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia.

À minha família que direta ou indiretamente me incentivaram pela concretização dessa etapa em minha vida profissional e por tudo que precisei em todos os momentos da minha vida.

Enfim, a todos aqueles que me auxiliaram de alguma forma na elaboração desse trabalho, o meu “muito obrigado”!

RESUMO

As amebas do gênero *Acanthamoeba* são protozoários de vida livre considerados patógenos oportunistas, pois em algumas situações podem causar graves infecções em humanos. Além de infecções encefálicas graves e quase sempre fatais, *Acanthamoeba* também está associada a uma infecção progressiva da córnea, a ceratite por *Acanthamoeba*. Atualmente, admite-se que existem linhagens patogênicas e não patogênicas de *Acanthamoeba*, as quais podem ser classificadas por métodos moleculares e testes biológicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente três cepas de *Acanthamoeba* de três diferentes grupos morfológicos e genótipos, em relação a um teste de patogenicidade *in vitro* (eritrofagocitose) e em modelo experimental de ceratite amebiana em ratos Wistar. Culturas axênicas de duas cepas isoladas de paciente com ceratite (cepa Krt2 grupo II/genótipo T4, cepa PEN grupo III/genótipo T5) e de uma cepa ambiental (SoA1 grupo I/genótipo T17), foram utilizadas. Uma cultura da cepa Krt2 associada à *Escherichia coli* letalmente irradiada também foi incluída nos experimentos. No ensaio *in vitro*, trofozoítos foram interagidos com eritrócitos humanos na proporção 1:100 por 20 minutos. As médias de eritrofagocitose foram 25,3%, 11,3%, 0,33% e 11,3% para as amostras Krt2, PEN, SoA1 e Krt2+*E.coli* Irrad, respectivamente. No ensaio *in vivo*, foram realizadas inoculações intraestromal de $2,5 \times 10^4$ trofozoítos das 4 diferentes culturas em ratos Wistar e avaliada a infectividade, investigando-se ainda a natureza das lesões e a presença de amebas, por meio de histopatologia e imuno-histoquímica. Somente a cepa SoA1 foi capaz de causar lesão na córnea de 2 ratos (n=9), com graus 1 e 3, tendo um deles desenvolvido ceratite ulcerada. As lesões foram caracterizadas por processo inflamatório típico de infecções por *Acanthamoeba*. Soro hiperimune produzido em rato Wistar com antígenos de cepa de genótipo T4 foi utilizado em técnica imunocitoquímica, que confirmou a marcação de trofozoítos. Nos cortes histológicos, não foram visualizados cistos. Grande quantidade de restos antigênicos imunorreativos de *Acanthamoeba* foi observada nos dois ratos com ceratite, sugerindo que o processo inflamatório encontrava-se em resolução da infecção. Em conclusão, *Acanthamoeba* é capaz de fagocitar eritrócitos humanos em baixa intensidade e o modelo de Ceratite por *Acanthamoeba* em ratos Wistar apresentou baixa taxa de infecção nas condições adotadas neste trabalho. No entanto, foi possível demonstrar a capacidade de *Acanthamoeba* de grupo I genótipo T17 de causar infecções em córnea e estabelecer a eficiência de método imunocitoquímico e imuno-histoquímico para marcação de *Acanthamoeba*, com perspectivas de padronização para diagnóstico.

Palavras chave: *Acanthamoeba*, Eritrofagocitose, Ceratite experimental, Ratos Wistar, Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Amoebas of the genus *Acanthamoeba* are free-living protozoa considered opportunistic pathogens, since in some situations they can cause serious infections in humans. Besides a severe and usually fatal brain infection, *Acanthamoeba* is also associated to a progressive corneal infection, the *Acanthamoeba* keratitis (AK). Currently, pathogenic and non-pathogenic strains are recognized among samples of *Acanthamoeba*, which can be classified by molecular methods and biological tests. The objective of this work was to evaluate three *Acanthamoeba* strains from three different morphological groups and genotypes through an in vitro pathogenicity test (erythrophagocytosis) and an experimental model of amoebic keratitis in Wistar rats. Three axenic cultures of strains isolated from a patient with keratitis (Krt2 group II / T4 genotype, PEN group III / T5 genotype) and from the environment (SoA1 group I / T17 genotype) were used. Krt2 strain associated with lethally irradiated *Escherichia coli* was also included in the experiments. In the in vitro assay, trophozoites were interacted with human erythrocytes in 1:100 ratios for 20 minutes. The mean values of erythrophagocytosis were 25.3%, 11.3%, 0.33% and 11.3% for Krt2, PEN, SoA1 and Krt2 + *E. coli* Irrad samples, respectively. In the in vivo assay, intrastromal inoculations of 2.5×10^4 trophozoites in Wistar rats were performed. The infectivity of each sample was determined, as well as the nature of the lesions and the presence of amoebas, which were investigated by histopathology and immunohistochemistry. Only SoA1 strain caused corneal lesions in two rats (n=9). The lesion grades were 1 and 3 and the rat with more severe lesion developed ulcerated keratitis. The lesions were characterized by an inflammatory process typical of *Acanthamoeba* infections. Hyperimmune serum produced in Wistar rat with antigens of a T4 genotype strain was used in immunocytochemical technique, which confirmed the labeling of trophozoites. In the histological sections, cysts were not seen. A large amount of *Acanthamoeba* immunoreactive antigenic residues were observed in both rats with keratitis, suggesting that the inflammatory process was in resolution of the infection. In conclusion, *Acanthamoeba* is able to phagocyte human erythrocytes at low intensity and the *Acanthamoeba* keratitis model in Wistar rats presented a low infection rate under the conditions adopted in this study. However, the ability of *Acanthamoeba* group I genotype T17 to cause corneal infections was showed in this study, which also allowed to establish the efficiency of immunocytochemical and immunohistochemical method, with prospects to be used for standardizing a diagnostic test.

Key words: *Acanthamoeba*, Erythrophagocytosis, Experimental keratitis, Wistar rats, Immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais eventos cronológicos na classificação de <i>Acanthamoeba</i> desde a primeira descoberta em 1930.....	16
Figura 2 - A <i>Acanthamoeba</i> foi isolada de ambientes naturais, artificiais e tecidos humanos.....	17
Figura 3 - Infecção ocular por <i>Acanthamoeba</i>	22
Figura 4 - Seção transversal da córnea.....	24
Figura 5 - Cascata patogênica da ceratite por <i>Acanthamoeba</i>	26
Figura 6 - Número de trofozoítos das cepas Krt2, Krt2 + <i>E. coli</i> , PEN e SoA1 de <i>Acanthamoeba</i> que realizaram eritrofagocitose e número de hemácias fagocitadas por trofozoíto.. ..	41
Figura 7 - Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> induzida em ratos Wistar por inoculação intraestromal de $2,5 \times 10^4$ trofozoítos em cultivo axênico e eutanasiado após 7 dias.	42
Figura 8 - Olho esquerdo de rato submetido à eutanásia 7 dias após a aplicação por via intraestromal de tampão fosfato (PBS).....	67
Figura 9 - Olho esquerdo de rato submetido à eutanásia 7 dias após a aplicação por via intraestromal de tampão fosfato (PBS).....	68
Figura 10 - Olho direito de rato submetido à eutanásia 7 dias após inoculação por via intraestromal de trofozoíto $2,5 \times 10^4$ de <i>Acanthamoeba</i> da cepa SoA1.	69
Figura 11 - Olho direito de rato submetido à eutanásia 7 dias após inoculação por via intraestromal de trofozoíto $2,5 \times 10^4$ de <i>Acanthamoeba</i> da cepa SoA1.	70
Figura 12 - Reação imunocitoquímica e imuno-histoquímica anti- <i>Acanthamoeba</i> . ..	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem e características fisiológicas de isolados de <i>Acanthamoeba</i>	33
Tabela 2 - Fagocitose de eritrócitos humanos por trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> pertencentes a três grupos e genótipos distintos	40
Tabela 3 - Infectividade e grau de infecção de <i>Acanthamoeba</i> ($2,5 \times 10^4$ trofozoítos) após inoculação intraestromal em córnea de ratos Wistar	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	percentual
°C	grau Celsius
h	hora
M	molar
mg	miligramas
mL	mililitros
µg	microgramas
µL	microlitros
µm	micrômetro
Kg	quilograma
ANOVA	Análise de Variância
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AVL	Amebas de Vida Livre
BSA	Albumina do Soro Bovino
CA	Ceratite Amebiana
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CPE	Efeito Citopático
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAB	Diaminobenzidina Tetrahydrocloro
EAG	Encefalite Amebiana Granulomatosa
Gy	Gray

HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSV	Vírus de Herpes Simples
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IP	Imunoperoxidase
KDa	Quilodalton
MAP	Meningoencefalite Amebiana Primária
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
MIP-133	Proteína induzida por manose de aproximadamente 133 kDa
MBP	Mannose Binding Protein
NNA	Ágar Não-Nutriente
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHMB	Polihexametileno Biguanida
PBS	Phosphate Buffered Saline
PYG	Proteose peptone, yeast extract, glucose
rRNA	Ribonucleic Acid
SNC	Sistema Nervoso Central
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USA	Estados Unidos da América

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 O gênero <i>Acanthamoeba</i> : histórico e classificação	14
2.2 Distribuição, morfologia	16
2.3 Importância clínica de <i>Acanthamoeba</i>	19
2.4 Ceratite por <i>Acanthamoeba</i>	20
2.4.1 Características epidemiológicas.....	20
2.4.2 Apresentação clínica, diagnóstico e tratamento	21
2.4.3 Fisiopatogenia da Ceratite por <i>Acanthamoeba</i>	24
3 TESTES DE PATOGENICIDADE PARA <i>Acanthamoeba</i>	27
4 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA CERATITE AMEBIANA	29
5 OBJETIVOS	32
5.1 Geral.....	32
5.2 Específicos	32
6. MATERIAIS E MÉTODOS	33
6.1 Cultivo de <i>Acanthamoeba</i>	33
6.2 Eritrofagocitose	34
6.3 Indução de ceratite por <i>Acanthamoeba</i> em modelo animal.....	35
6.4 Avaliação da infectividade e do grau macroscópico da ceratite.....	36
6.5 Avaliação histopatológica	37
6.6 Produção de anticorpos policlonais anti- <i>Acanthamoeba</i>	37
6.7 Reação imunocitoquímica anti- <i>Acanthamoeba</i>	38
6.8 Reação imuno-histoquímica anti- <i>Acanthamoeba</i>	39
7. RESULTADOS	40
7.1 Eritrofagocitose	40
7.2 Infectividade e grau macroscópico da ceratite induzida em ratos	41
7.3 Avaliação histopatológica	43
7.4 Avaliação da reatividade dos anticorpos policlonais anti- <i>Acanthamoeba</i> por imunocitoquímica	44
7.5 Padronização e avaliação imuno-histoquímica	44
8 DISCUSSÃO	45

9 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXO I – MEIOS DE CULTIVO E SOLUÇÕES PARA CULTURA DE <i>Acanthamoeba</i>.....	65
ANEXO II – PRANCHAS COM IMAGENS MICROSCÓPICAS DE LESÕES EM CórNEA DE RATOS WISTAR INDUZIDA POR <i>Acanthamoeba</i>.....	67
ANEXO III – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).....	72

1 INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários distribuídos amplamente na natureza, tanto em ambientes naturais como artificiais. No decorrer das últimas décadas as AVL ganharam atenção dos pesquisadores, devido aos diversos papéis no ecossistema e por causarem infecções graves em seres humanos, bem como em animais (SIDDIQUI; KHAN, 2012). Por sua capacidade de viverem em vida livre no ambiente e eventualmente atuarem como organismos oportunistas, são conhecidos como anfitriões (LORENZO-MORALES *et al.*, 2013).

As AVL capazes de causar infecções em seres humanos são as espécies do gênero *Acanthamoeba*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e *Sappinia pedata*. São causadoras de raras infecções encefálicas, que podem ter evolução rápida como as causadas por *N. fowleri*, ou de curso crônico, geralmente associado à imunodepressão, como determinadas pelas demais amebas. Uma alta letalidade é observada nessas infecções (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

De todas as AVL, *Acanthamoeba* é considerada a mais frequente no ambiente e, portanto, com maior contato com o ser humano (HOFFMANN; MICHEL, 2001). Além das infecções encefálicas, *Acanthamoeba* é causadora da ceratite amebiana (CA), uma grave infecção da córnea, em que a frequência de casos tem aumentado nos últimos anos devido ao crescente número de usuários de lentes de contato (RADFORD; MINASSIAN; DART, 2002).

Dentre os fatores mencionados que levam a ocorrência de CA, a linhagem de *Acanthamoeba* tem sido considerada importante. Essas amebas são classificadas em genótipos com base na sequência de fragmentos 18S rRNA, sendo que o T4 é o mais associado a casos de infecções (STOTHARD *et al.*, 1998; SCHROEDER *et al.*, 2001; BOOTON *et al.*, 2005; CORSARO; VENDITTI, 2010; MACIVER *et al.*, 2013). Algumas propriedades fisiológicas de diferentes isolados têm sido investigadas em testes *in vitro*, que parecem ter associação com genótipos mais patogênicos, conforme mostrado em diversas publicações (SHUSTER; VISVESVARA, 2004; KHAN; TAREEN, 2003; LORENZO-MORALES *et al.*, 2005; POSSAMAI *et al.*, 2018). Testes *in vivo*, com modelos animais, também têm sido empregados para avaliação da patogênese da CA (LARKIN; EASTY, 1991; POLAT, 2007) e como modelos para

avaliação diagnóstica (COSTA *et al.*, 2017) e de medicamentos (VASSENEIX *et al.*, 2006). No entanto, não há dados que comparem a progressão e gravidade da CA frente aos diferentes grupos e genótipos.

A proposta desse trabalho foi a de comparar três cepas de *Acanthamoeba* de três diferentes grupos e genótipos quanto à sua capacidade de realizar eritrofagocitose (teste *in vitro*) e de causar ceratite em modelo experimental animal (teste *in vivo*). A estratégia experimental para o ensaio “*in vitro*” foi interagir eritrócitos humanos com trofozoítos das cepas, avaliando o índice de eritrofagocitose. Para o ensaio *in vivo*, foi avaliada a infectividade em ratos Wistar inoculados pela via intraestromal com diferentes cepas de trofozoítos, investigando-se ainda a natureza das lesões e o parasitismo, por meio de histopatologia e imuno-histoquímica, respectivamente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Acanthamoeba*: histórico e classificação

As amebas do gênero *Acanthamoeba* foram primeiramente descritas em 1930 por Castellani em culturas da levedura *Cryptococcus pararoseus* (CASTELLANI, 1930). O pesquisador encontrou essas formas como contaminantes nas culturas desse fungo e inicialmente a denominou *Hartmannella castellanii* (CASTELLANI, 1930; DOUGLAS, 1930). Por algum tempo houveram discussões sobre a divisão dos gêneros *Hartmannella* e *Acanthamoeba* e sua diferenciação morfológica, até que Pussard (1966) e Page (1967) ambos admitiram os gêneros e a denominação de *Acanthamoeba castellanii* para as amebas descritas em 1930. Segundo os autores, a morfologia do cisto e a presença de acantopódios seriam critérios suficientes para identificar *Acanthamoeba*.

Já na década de 70, a diversidade dentro do gênero *Acanthamoeba* ficou evidente e foi proposta uma classificação em 3 grupos com base na morfologia dos cistos. Na tentativa de organizar o número crescente de isolados pertencentes a este gênero, Pussard e Pons (1977) subdividiram 18 espécies de *Acanthamoeba* em três grupos morfológicos distintos (I, II, III), proposta admitida por outros autores (DE JONCKHEERE, 1987; PAGE, 1988).

As espécies definidas no grupo morfológico I são representadas por espécies consideradas não patogênicas até então, como *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata*. Apresentam cistos grandes (diâmetro médio $\geq 18 \mu\text{m}$) que se destacam pela forma estrelada do endocisto e ectocisto bem separado/evidente, de aspecto liso (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; QVARNSTROM; NERAD; VISVESVARA, 2013).

O grupo II abriga a maioria das espécies de *Acanthamoeba*, sendo elas *A. mauritaniensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. grijfini*, *A. rhyssodes* e a *A. paradiunionensis*. Seus cistos apresentam tamanho médio com diâmetro $\leq 18 \mu\text{m}$, ectocisto rugoso e endocisto com forma variada, desde estrelada, oval, triangular ou quadrangular (KHAN, 2006).

No grupo III estão às espécies como a *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* e *A. pustulosa*, e as características peculiares císticas de diâmetro médio

geralmente < 18 µm, se diferenciam pelo endocisto, que varia de poligonal a oval e o ectocisto liso, justaposto ao endocisto (KHAN, 2006; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

Para muitos autores, o critério morfológico para identificação das espécies de *Acanthamoeba* é muito subjetivo, porque as características dos cistos são influenciadas pelas condições ambientais e de cultivo. Entretanto, mesmo controlando as condições de cultivo e de encistamento, relata-se que diferentes espécies apresentam aspectos similares em seus cistos e que em cultivos monoclonais observam-se tais estruturas morfológica variável (STRATFORD; GRIFFITHS, 1978; VISVESVARA, 1991).

Posteriormente, outras técnicas foram sendo pesquisadas para determinar a diversidade com maior precisão, dentro do gênero *Acanthamoeba*, como perfil de isoenzimas (DE JONCKHEERE, 1983), polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) (BOGLER *et al.*, 1983), perfil de ácidos graxos (COSTAS; GRIFFITHS, 1984).

Em 1996, uma abordagem alternativa ao sequenciamento do 18S rRNA de *Acanthamoeba* foi executada. A dissimilaridade de sequência maior que 5% foi para determinar 4 genótipos, denominados T1 a T4 (GAST *et al.*, 1996). Subsequentemente, outros 15 genótipos foram relatados, resultando nos tipos T1 a T19 (CORSARO; VENDITTI, 2010; GAST, 2001; HEWETT *et al.*, 2003; HORN *et al.*, 1999; LANOCHA *et al.*, 2009; MAGNET *et al.*, 2014; NUPRASERT *et al.*, 2010; QVARNSTROM *et al.*, 2013). Mais recentemente, foi designado o genótipo T20 (FUERST; BOOTON; CRARY, 2015; CORSARO *et al.*, 2015, 2017).

Atualmente, embora a classificação nos grupos I, II e III ainda seja usada especialmente nos trabalhos de triagem ambiental (POSSAMAI *et al.*, 2018; CORSARO *et al.*, 2015; QVARNSTROM *et al.*, 2013), a classificação em genótipos é sempre adotada, quando se isola uma nova linhagem do ambiente ou de casos de infecção. **A Figura 1** descreve os principais eventos na classificação de *Acanthamoeba* em ordem cronológica desde sua descoberta até os avanços recentes.

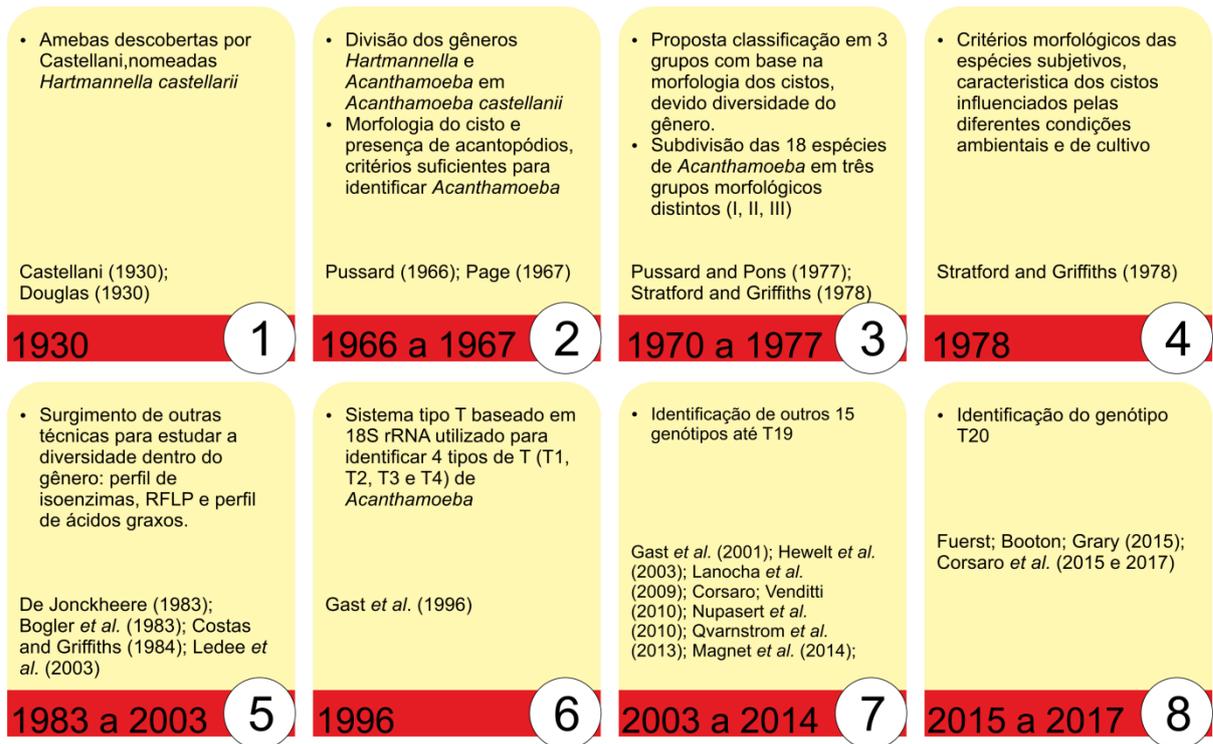


Figura 1 - Principais eventos cronológicos na classificação de *Acanthamoeba* desde a primeira descoberta em 1930

2.2 Distribuição, morfologia

As AVL do gênero *Acanthamoeba* são as mais frequentemente isoladas em amostras ambientais diversas e encontradas em uma variedade de locais naturais e artificiais (**Figura 2**). São consideradas cosmopolitas estando presentes em rios, lagos, piscinas e água de abastecimento público (ARMSTRONG, 2000). Também foram isoladas de pombos, peixes de água doce, bem como em outros animais saudáveis, doentes ou mortos. Por exemplo, em pesquisa recente, as vísceras de répteis capturados nas Ilhas Canárias (Tenerife, Espanha) foi detectado a presença de *Acanthamoeba*. Com base no exposto, é amplamente aceito que AVL são onipresentes no meio ambiente e que geralmente esses organismos estão em constante contato com o ser humano (HOFFMANN; MICHEL, 2001).

Segundo Cursons e colaboradores (1980), a exposição comum dos seres humanos a este organismo foi demonstrada pela determinação de títulos de anticorpos anti-*Acanthamoeba* em populações saudáveis. Uma pesquisa com indivíduos assintomáticos na Nova Zelândia verificou que os soros de 100% dos indivíduos testados continham anticorpos com títulos que variavam de 1:20 a 1:80 para *Acanthamoeba* (CURSONS *et al.*, 1980). Tal fato leva ao questionamento da baixa

incidência das infecções, sugerindo que o sistema imunológico do hospedeiro seja um fator importante na ocorrência e desenvolvimento da doença. Outros estudos mostraram que 50 a 100% de indivíduos com níveis séricos de IgG e IgA normais possuíam anticorpos contra antígenos de *Acanthamoeba* (CERVA, 1989; CURSONS *et al.*, 1980).

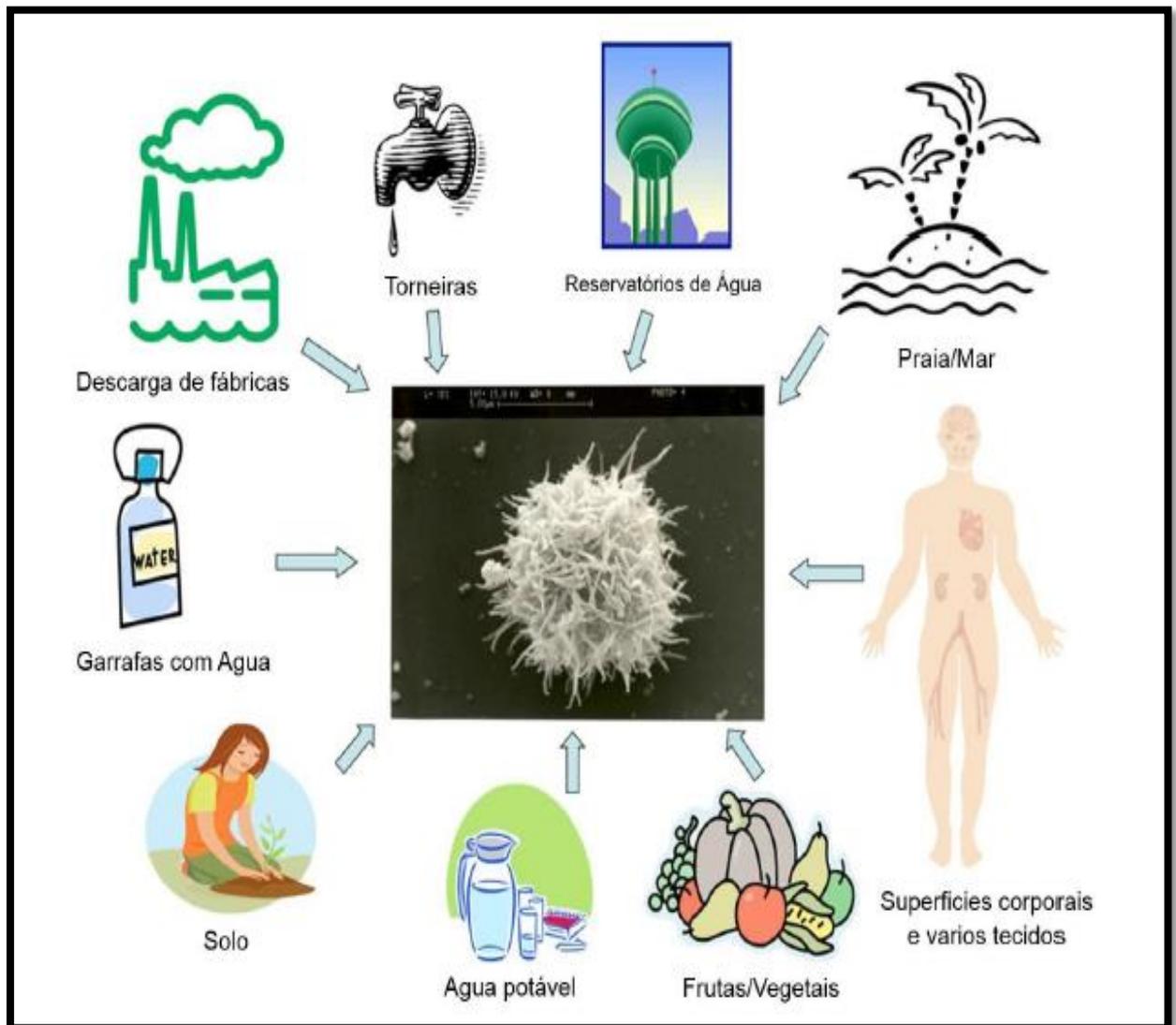


Figura 2 - A *Acanthamoeba* foi isolada de ambientes naturais, artificiais e tecidos humanos. Fonte: Adaptado de KHAN, 2015, p. 67.

Acanthamoeba apresenta duas formas evolutivas em seu ciclo de vida: cisto e trofozoíto. O cisto é a forma de resistência que permanece viável por longos anos no ambiente quando as condições do meio são desfavoráveis ao metabolismo (KHAN; TAREEN, 2003). O cisto mede cerca de 13 a 20 μm , sendo que estes valores podem variar de uma espécie para outra. Quando maduro, apresenta uma parede cística resistente, com uma camada mais externa, o ectocisto, composto de uma combinação de proteínas e polissacarídeos, e uma mais interna o endocisto usualmente espesso, com formato radiado, poligonal, redondo ou oval e composto de celulose (MOON *et al.*, 2014).

A forma de *Acanthamoeba* conhecida como trofozoíto mede de 14 a 40 μm de diâmetro, são formas ativas que se alimentam de matéria orgânica, outros microrganismos e se dividem por fissão binária. Em condições adversas, como a falta de alimentos, extremos de temperatura, pH e osmolaridade ou dessecação, os trofozoítos se diferenciam em cistos (KHAN, 2003; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). Podem mudar suas formas devido a movimentos pseudopodiais, de onde emergem estruturas em formas de espinhos, chamados acantopódios, importantes para a alimentação e movimento celular. A célula exibe núcleo com seu grande nucléolo central, possui uma extensa rede de retículo endoplasmático com ribossomos ligados. O citoplasma apresenta um grande número de vacúolos, entre os quais, um de natureza contrátil, responsável pelo controle osmótico da célula, e os demais de natureza digestiva (KHAN, 2006; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; EDAGAWA *et al.*, 2009).

A importância clínica de *Acanthamoeba* se estabeleceu tanto por sua capacidade de albergar outros organismos patogênicos quanto por ser causadora de doenças. Diversos patógenos têm sido encontrados no interior de trofozoítos, como bactérias Gram positivas quanto negativas, com preferência ao segundo grupo (BOTTONE *et al.*, 1994). O papel de *Acanthamoeba* em agir como reservatórios biológicos para patógenos bacterianos são de grande importância (GREUB; RAOULT, 2004). Portanto, é uma preocupação para saúde pública, como patógenos humanos e a capacidade de abrigar outros microrganismos, permitindo que proliferem, isolando-os do sistema imunológico do hospedeiro e da ação de drogas, bem como sua dispersão no ambiente (KHAN; SIDDIQUI, 2014).

2.3 Importância clínica de *Acanthamoeba*

Como causadora de doenças, *Acanthamoeba* é responsável por um tipo de encefalite quase sempre fatal, a Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) e pela infecção de córnea conhecida como ceratite por *Acanthamoeba* ou ceratite amebiana (CA), explicitada na seção posterior (2.4).

A EAG também é causada por outra espécie de AVL, *Balamuthia mandrillaris* e apresenta índice de mortalidade superior a 90%. A doença acomete predominantemente indivíduos imunocomprometidos, tais como os portadores de HIV/AIDS, diabéticos descompensados e pacientes transplantados (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). As vias de entrada da *Acanthamoeba* incluem o trato respiratório baixo, que determina infecções pulmonares prévias e por lesões na pele, em um quadro conhecido como Acantamebíase cutânea. Por disseminação hematogênica, as amebas acessam o sistema nervoso central (SNC) atravessando a barreira hematoencefálica, especificamente pelo revestimento endotelial dos capilares cerebrais (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; KHAN, 2008; MARTINEZ, 1991).

A evolução da doença é usualmente fulminante e geralmente o diagnóstico só é alcançado após necropsia, por análise do líquido cefalorraquidiano ou do próprio tecido cerebral, através da análise microscópica das formas trofozoíticas (DIAZ, 2010; DA ROCHA-AZEVEDO; TANOWITZ; MARCIANO-CABRAL, 2009).

O tratamento da EAG é extremamente problemático devido aos sintomas inespecíficos e à falta de um bom teste diagnóstico confiável. Além disso, a modalidade de manejo ideal permanece incerta. Vários fármacos demonstraram atividade *in vitro* contra a *Acanthamoeba* e o tratamento obteve sucesso em alguns pacientes quando usados sozinhos ou em combinação: rifampicina, azóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol), isotionato de pentamidina, sulfadiazina, flucitosina, azitromicina, miltefosina e caspofungina (SHUSTER; VISVESVARA, 2004; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; MARTINEZ *et al.*, 2010).

Acanthamoeba também é causadora de uma grave infecção ocular, que se caracteriza pela inflamação da córnea e pode evoluir para perda parcial ou total da visão. As características dessa infecção são detalhadas na seção a seguir.

2.4 Ceratite por *Acanthamoeba*

2.4.1 Características epidemiológicas

A ceratite amebiana ou ceratite por *Acanthamoeba* (CA) que, diferentemente da EAG, não tem associação com hospedeiros imunodeprimidos ou debilitados, ocorre basicamente em indivíduos imunocompetentes e sendo mais frequente em usuários de lentes de contato (SOUZA-CARVALHO *et al.*, 2011; LORENZO-MORALES *et al.*, 2013; OMAÑA-MOLINA *et al.*, 2013).

Os principais fatores que levam à CA são o uso de lentes de contato por longos períodos; enxágue de lentes de contato em soluções não estéreis; a má higienização dos estojos de lentes de contato, o que favorece a proliferação microbiana e a formação de biofilmes na superfície das lentes. As amebas também podem contaminar a lente devido a atividades de natação enquanto se usa esse acessório ou ainda, devido a traumas na córnea em não usuários de lentes. No caso dos traumas na córnea, agentes externos como partículas de solo, plantas ou qualquer outro material carregam as amebas, podendo desencadear o processo infeccioso (SIDDIQUI; KHAN, 2012).

Os casos de CA diagnosticados têm aumentado drasticamente nos últimos vinte anos nos países em desenvolvimento, correlacionando-se ao aumento do número de usuários de lentes de contato. O número estimado de CA é de 1,36 casos por milhão de lentes de contato nos Estados Unidos, já na Inglaterra 17 a 21 casos por milhão. Por outro lado, na França, a CA é rara, com um caso por 30.000 lentes de contato, mas sua incidência tem aumentado constantemente (SEAL, 2003; BOURCIER; ZAMPHIR; CHAUMEIL, 2007). No Brasil, não há estudos amplos sobre a ocorrência da infecção, porém a tendência de aumento vem sendo observada em estudos realizados em São Paulo (CARVALHO *et al.*, 2009). No Rio Grande do Sul, pesquisas têm sido realizadas em espécies de *Acanthamoeba* provenientes de uma variedade de fontes de água, conhecidas por causar CA e EAG em humanos (CAUMO; ROTT, 2011).

Normalmente, a maioria dos casos de CA é unilateral, entretanto, há relatos raros de casos descritos em que há comprometimento bilateral (OBEID *et al.*, 2003; WILHELMUS *et al.*, 2008; DI CAVE *et al.*, 2009; KIM; KIM, 2009). É importante

ressaltar a importância do trauma na córnea como pré-requisito da CA, em portadores ou não de lentes de contato, uma vez que as córneas íntegras não propiciam o desenvolvimento da infecção. As lentes, particularmente, desencadeiam micro traumas que servem como porta de entrada (NIEDERKORN *et al.*, 1999). Considerando esses aspectos, pode-se evitar a CA por meio da prevenção pela educação dos usuários de lentes de contato: (i) as lentes de contato e seus estojos; (ii) tanto as lentes quanto seus estojos devem ser trocadas regularmente; (iii) não usar lentes de contato ao se banhar em lagoas, rios, mar, banheira de hidromassagem (iv) não usar lentes de contato ao praticar esportes aquáticos (VISVESVARA; SCHUSTER, 2008; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015).

O genótipo T4 é o mais encontrado nessas infecções, seguido pelos genótipos T3 e T11 que são considerados parentes próximos de T4 e são o segundo e o terceiro mais frequentemente associados a CA respectivamente (MACIVER *et al.*, 2013).

2.4.2 Apresentação clínica, diagnóstico e tratamento

Clinicamente os sintomas da infecção de CA estão ligados à invasão e a degradação dos componentes da córnea, ocasionando uma infecção progressiva caracterizada por dor intensa, vermelhidão da conjuntiva, edema, sensação de corpo estranho, fotofobia e lacrimejamento (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; KINNEAR, 2004; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; CARNT; STAPLETON, 2016). A dor relatada em muitos casos é provocada pela ceratoneurite radial, que corresponde ao contato de amebas com as células nervosas no estroma da córnea e nem sempre está relacionada diretamente com a gravidade do quadro clínico (CLARKE; NIEDERKORN, 2006a).

Inicialmente as amebas ficam restritas ao epitélio da córnea, provocando erosões epiteliais puntiformes. Os sintomas da CA nessa fase em muito se assemelham aos da ceratite causada por vírus de herpes simples (HSV). O uso prévio de lentes de contato associado à dor local intensa é um forte indício de CA (KHAN, 2006; VISVESVARA, 2010).

Mais tardiamente, as amebas invadem o estroma da córnea, causando anormalidades estromais como opacidade e inflamação, provocadas pela presença de neutrófilos, que geram um infiltrado em forma de anel típico de uma CA avançada

(Figura 3). Se não diagnosticada precocemente e tratada prontamente, muitas complicações podem se desenvolver na fase tardia da doença, como ulceração epitelial da córnea, perfuração, perda da acuidade visual e, eventualmente, cegueira com necessidade de enucleação e infecções microbianas secundárias (MANNIS *et al.*, 1986; ILLINGWORTH *et al.*, 1995; LORENZO-MORALES *et al.*, 2013).

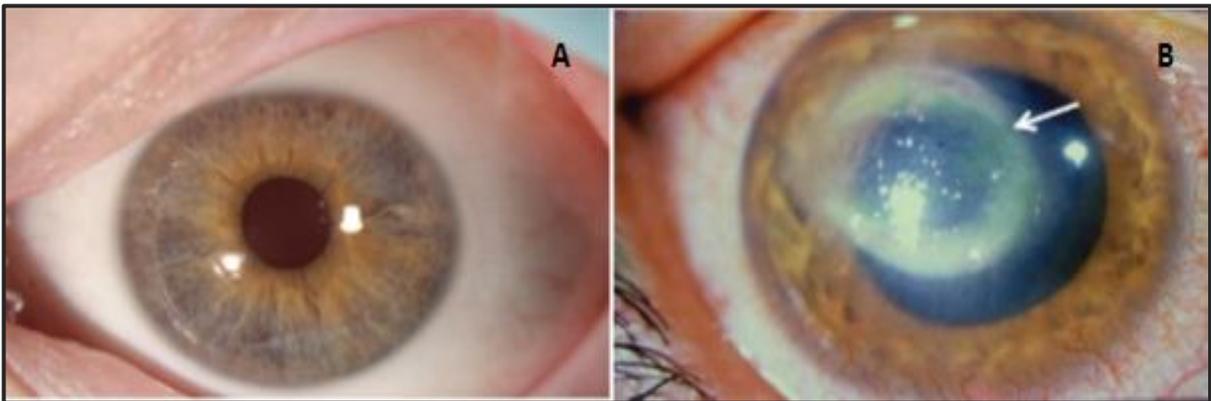


Figura 3 - Infecção ocular por *Acanthamoeba*: A. Olho humano normal (reimpresso com permissão do National Eye Institute) e B. Olho com ceratite por *Acanthamoeba*. O infiltrado estromal em forma de anel (seta) é uma característica da ceratite por *Acanthamoeba*.

Fonte: modificado de CLARKE; NIEDERKORN, 2006, p. 176.

Um dos pontos mais importantes no manejo da ceratite amebiana é o seu diagnóstico e tratamento. Nas suas fases iniciais, a infecção pode ser confundida com outras ceratites infecciosas, especialmente fúngica e herpética (WALOCHNIK; OBWALLER; ASPOCK, 2000). A CA então progride e os protozoários que inicialmente se instalam no epitélio da córnea, atingem o estroma, dificultando o tratamento. A eficiência das drogas também é afetada pela transformação das amebas em suas formas trofozoíticas para o estágio de cisto, que é mais resistente (KHAN; SIDDIQUI, 2012).

O diagnóstico adequado baseia-se na identificação de trofozoítos e cistos nas amostras de raspagem e biópsia da córnea infectada, além da análise das lentes de contato e / ou de suas caixas (estojos). Porém, a análise de lentes e estojos é apenas indicativa de possibilidade de infecção por ameba, não podendo ser usada como critério único de diagnóstico (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). Os trofozoítos podem ser visualizados por coloração de raspagens de córnea com corantes hematoxilina-eosina ou com corantes mais específicos, como o branco de calcofluor, que reage especificamente com as paredes celulósicas dos cistos. A amostra pode ser semeada em meio apropriado para o isolamento e crescimento de

Acanthamoeba, que consiste em ágar semi-sólido recoberto por bactérias *Escherichia coli* inativada (NEFF, 1958; IKEDA *et al.*, 2012).

A microscopia confocal *in vivo* surgiu como uma ferramenta não invasiva que também pode auxiliar no diagnóstico. Nessa técnica, as amebas podem ser visualizadas *in situ* no consultório oftalmológico. Métodos moleculares como PCR, e PCR em tempo real também têm sido usados e, geralmente, são mais sensíveis do que as colorações e culturas específicas (VISVESVARA, 2010; TRABELSI *et al.*, 2012; IKEDA *et al.*, 2012).

Os recursos utilizados na intervenção para infecções de espécies de *Acanthamoeba* são empíricos, fundamentados em numerosas combinações de antimicrobianos (LORENZO-MORALES *et al.*, 2010; ROBERTS; HENRIQUEZ, 2010). Muitos deles têm efeito sobre os trofozoítos, mas são pouco efetivos sobre os cistos, que podem levar à recidiva da infecção (SHUSTER; VISVESVARA, 2004; DART; SAW; KILVINGTON, 2009).

Dentre as várias variedades de drogas atualmente recomendadas para o tratamento de CA, estão clorexidina, polihexametileno biguanida (PHMB), isotionato de propamidina (Brolene), isotionato de dibromopropamidina, neomicina, paromomicina, polimixina B, clotrimazol e itraconazol. O recurso terapêutico da infecção ocular é difícil e de longo prazo, utilizando normalmente dois medicamentos em combinação. As drogas são de aplicação tópica e pelo menos nos dias iniciais, devem ser administradas de hora em hora, sendo que cada uma separadamente, resultando em intervalos de aplicação de 30 minutos. Portanto, o paciente fica impossibilitado inclusive de dormir durante a noite nesse regime terapêutico. Subsequentemente o número de aplicações por dia é reduzido, podendo durar vários meses, chegando a um ano (SEAL, 2003; LORENZO-MORALES *et al.*, 2010; TRABELSI *et al.*, 2012).

Falhas no tratamento médico podem ocorrer, o debridamento (raspagem da lesão) e / ou a ceratoplastia penetrante (Transplante Lamelar de Córnea) vem sendo utilizados, com bons resultados em alguns casos. A aplicação de esteroides é comum, tanto para aliviar a dor como para diminuir a inflamação, particularmente após a ceratoplastia (SEAL, 2003, TRABELSI *et al.*, 2012). Não aderir ao

tratamento pode levar à ulceração da córnea, com presença de infiltrado no estroma, perfuração e finalmente, perda da visão (SAEED *et al.*, 2009).

2.4.3 Fisiopatogenia da Ceratite por *Acanthamoeba*

A córnea é a parte mais externa do olho e é composta por cinco camadas distintas: o epitélio, a membrana de Bowman, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio (**Figura 4**). A membrana de Bowman, composta de colágeno tipo IV, separa o epitélio da córnea do estroma anterior.

O estroma consiste em várias camadas de ceratócitos que desenvolvem e mantêm uma matriz extracelular colagenosa, composta principalmente de colágeno tipo I. Abaixo do estroma encontra-se a membrana de Descemet, composta por colágeno tipo IV e VIII numa matriz glicoproteica. O endotélio da córnea é uma camada única de células entre a membrana de Descemet e câmara anterior.

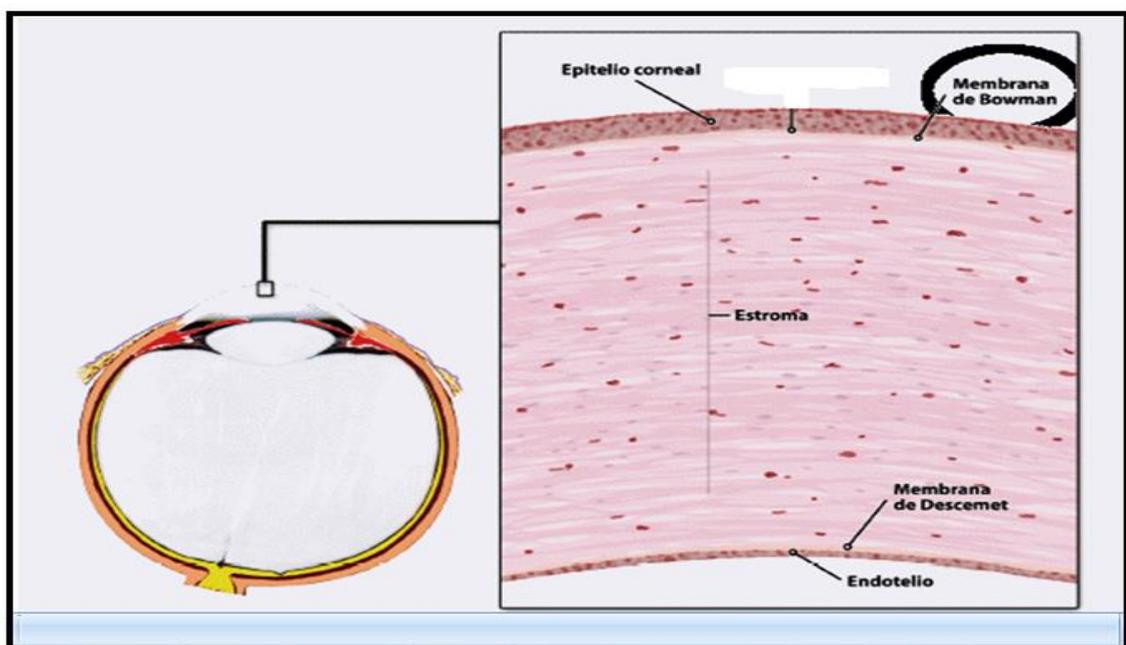


Figura 4 - Seção transversal da córnea

Fonte: Imagem adaptada de MEENEY; MUDHAR, 2013, p. 273.

Inflamações e infecções da córnea causadas por diversos microrganismos podem deixar sequelas, já que os agentes, como as amebas, acarretam opacidade do tecido e, conseqüentemente, a diminuição da habilidade de enxergar (JONES; LIESEGANG; ROBINSON, 1981).

Para o desenvolvimento da ceratite por *Acanthamoeba* há uma sequência de eventos, que constitui uma cascata patogênica. As seguintes etapas podem ser identificadas: adesão às células ou superfícies epiteliais, secreção de proteases, que desorganizam estes tecidos e, por último, fagocitose celular, (**Figura 5**) (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; CLARKE *et al.*, 2012; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

A adesão epitelial e descamação são observadas pela secreção de substâncias citolíticas (fosfolipases, proteases de serina, proteinases de cisteína, metaloproteinases, ativadores de plasminogênio) por *Acanthamoeba* e sua ação fagocitária produzem uma acelerada descamação das células epiteliais da córnea, muitas das quais entram em apoptose.

A adesão de *Acanthamoeba* ao epitélio é dependente, entre outros fatores, da condição fisiológica da córnea. Em estudos com testes *in vivo* em animais com córnea intacta, a infecção não pode ser estabelecida, porque é necessário que ocorra um trauma para estabelecer a adesão (NIEDERKORN *et al.*, 1999). As etapas de invasão começam quando uma proteína ligadora de manose (MBP- Mannose Binding Protein) de 136 kDa da ameba reconhece as glicoproteínas de manose na superfície do tecido epitelial (CLARKE; NIEDERKORN, 2006, GARATE *et al.*, 2006). A expressão dessas glicoproteínas reativada para *Acanthamoeba* é 1,8 vezes maior no tecido lesado do que no tecido sadio, o que facilita a adesão e, portanto, a invasão (JAISON; CAO; PANJWANI, 1998).

A Invasão estromal ocorre posteriormente à adesão mediada pela MBP, a *Acanthamoeba* produz um efeito citopático que inclui a morte das células hospedeiras, a degradação do epitélio da membrana basal e a matriz estromal, penetrando assim nas camadas mais internas da córnea, produzindo um infiltrado em forma de anel característico, conforme já mostrado na **Figura 3 B**.

A interação patógeno-hospedeiro, mediada por MBP, induz à secreção de proteases que atuam conjuntamente produzindo o efeito citopático. A metaloproteinases citotóxica (P3), por exemplo, foi descrita nessas amebas como dependente da adesão, ou seja, sua secreção é inibida se a adesão é evitada (CAO; JEFFERSON; PANJWANI, 1993). Outra protease bem descrita é a MIP-133, uma serino protease induzida por manose com peso de 133 KDa e que apresenta atividade citotóxica

(HURT *et al.*, 2003; PANJWANI, 2010). Portanto, a transdução de sinal possivelmente mediada pelo domínio citoplasmático da MBP que desempenha um papel fundamental na regulação da secreção de proteinases citotóxicas dependentes de contato. *Acanthamoeba* produz e secreta no meio, diversas outras proteases que atuam na patogênese e apresentam variação tanto na quantidade quanto na natureza, dependendo da cepa ou genótipo (KHAN *et al.*, 2000).

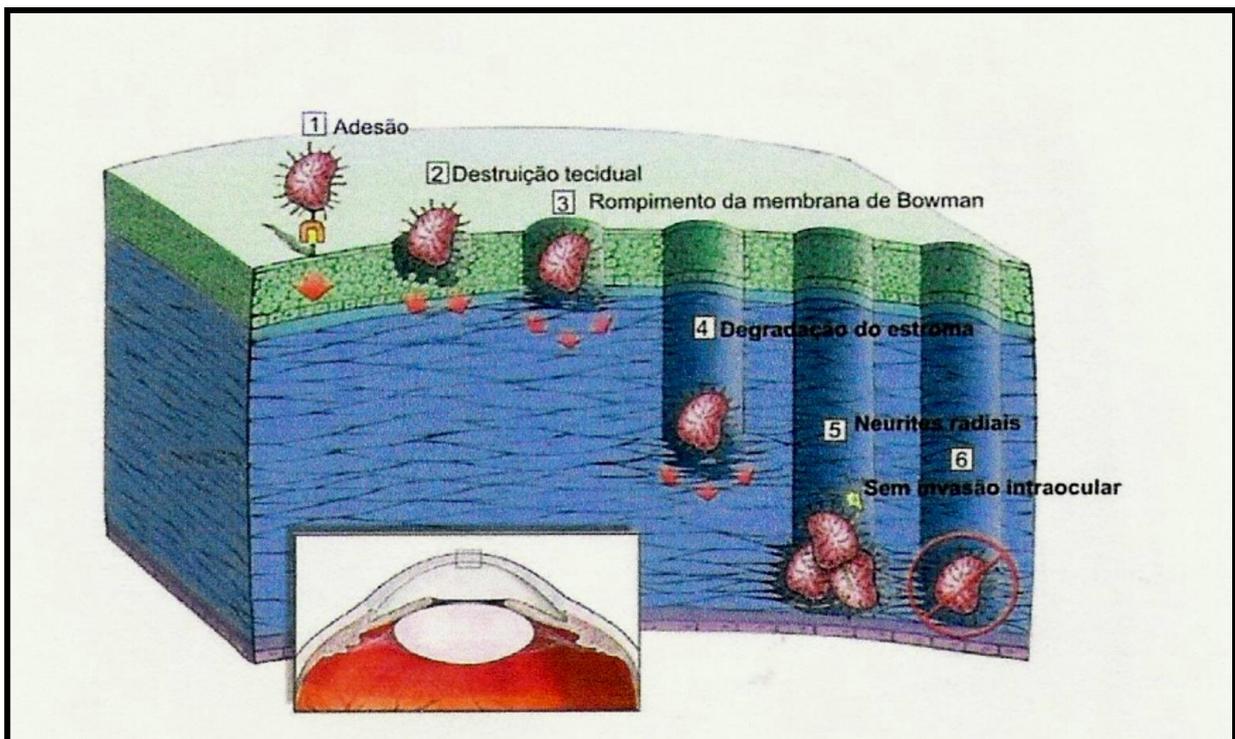


Figura 5 - Cascata patogênica da ceratite por *Acanthamoeba*: 1. Adesão 2. Produção de proteinase induzida por manose 3. Rompimento da membrana de Bowman e invasão do estroma 4. Produção de protease 5. Ataque aos nervos córneos 6. Estabelecimento da infecção.

Fonte: Adaptado de CLARKE; NIEDERKORN, 2006, p. 176

3. TESTES DE PATOGENICIDADE PARA *Acanthamoeba*

Conforme relatado anteriormente, a variabilidade dentro do gênero *Acanthamoeba* é, atualmente, reconhecida pela existência de genótipos distintos (POSSAMAI *et al.*, 2018; CORSARO *et al.*, 2015; QVARNSTROM *et al.*, 2013).

O filme lacrimal e as células epiteliais da córnea criam um ambiente que expõe microrganismos, como a *Acanthamoeba*, a condições de elevada osmolaridade, decorrente a salinidade do filme lacrimal. Também são expostos a temperaturas e também pH variáveis (KHAN, 2006; TRABELSI *et al.*, 2012). Nesse sentido, diversos estudos têm buscado associar a patogenicidade de isolados ou cepas com certas características fisiológicas, analisadas em testes *in vitro*, principalmente a termotolerância, osmotolerância e o efeito citopático.

Para análise da termotolerância analisa-se o crescimento do microrganismo associada à temperatura corporal humana (37°C) ou temperaturas mais elevadas (WALOCHNIK; OBWALLER; ASPOCK, 2000; KHAN; JARROLL; PAGET, 2001). Grifiin (1972) e De Jonckheere (1980) verificaram que, para isolados de *Naegleria* e *Acanthamoeba*, a patogenicidade está relacionada à termotolerância uma vez que cepas fracamente ou não patogênicas são incapazes de crescer em temperaturas corporais normais ou elevadas.

Quanto à osmolaridade, testes *in vitro* demonstraram que *Acanthamoeba* patogênicas são propícias a crescer e sobreviver a condições de alta pressão osmótica no meio, como a 1 M de manitol (KHAN, 2006).

Outra característica adotada é a capacidade das amebas dos diferentes isolados em causar efeito citopático (CPE) com a utilização de linhagens celulares de mamíferos, destruindo essas células. Alguns estudos mostram que existe uma associação entre CPE e potencial de causar doença em animais de experimentação (CURSONS; BROWN, 1978; DE JONCKHEERE, 1980).

Acredita-se que a quantidade e atividade de proteases extracelulares é outro dos importantes fatores relacionados à patogenicidade dos isolados de *Acanthamoeba*, já que utilizam proteases para catalisar a hidrólise total de proteínas usadas como

alimento e ajudar sua invasão tissular do hospedeiro (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Capacidade e velocidade de encistamento também já foram usadas como critério de patogenicidade. Essa evidência é sustentada por resultados de testes *in vitro* que demonstraram maior velocidade de crescimento e encistamento de amostras clínicas em relação às do ambiente, sugerindo que poderiam estabelecer infecção mais facilmente e persistir no hospedeiro (DA ROCHA-AZEVEDO; COSTA E SILVA-FILHO, 2007).

A caracterização da patogenicidade de *Acanthamoeba* por meio de sua capacidade de interagir com eritrócitos humanos é relatada em raros estudos (RABINOVITCH; STEFANO, 1971; NACAPUNCHAI *et al.*, 2005). Porém em outros microrganismos, tal como na *Entamoeba histolytica*, é considerada um indicador importante de virulência (OMS, 1969; CRAIG, 1944; WILCOEKS; MANSON-BAHR, 1972). *E. dispar*, ameba considerada avirulenta em seres humanos e de morfologia similar a anterior, fagocita eritrócitos *in vivo* e *in vitro* apenas ocasionalmente e em menor quantidade quando comparada à *E. histolytica* (ZAMAN, 1970; LYNCH, 1924; TYZZER; QUENTIN, 1938; BOETTNER *et al.*, 2005).

4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CERATITE AMEBIANA

Modelos animais são de grande importância para compreender a patogênese de diversas doenças, incluindo da Acanthamebíase. Para essa infecção, o uso de animais experimentais iniciou-se em 1975, na investigação de infecção encefálica em primatas não humanos (WONG; KARR; BALAMUTH, 1975). Os trabalhos seguintes já partiram para a avaliação de modelos de CA, com o uso de coelhos em que foi feita após inoculação intraestromal e administração subconjuntival de corticoides (FONT *et al.*, 1981, 1982, citado em LARKIN; EASTY, 1990). Desde então, vários estudos usando diferentes modelos animais vem sendo realizados.

Larkin e Easty (1990) foram os primeiros a estudar o modelo de CA em ratos, por meio de inoculações intraestromal de *Acanthamoeba*, que resultaram em lesões semelhantes às observadas em humanos. Nesse estudo, foram relatadas opacidade granular e infiltração superficial progressiva da córnea, associada à vascularização discreta, mas sem perfuração e uveíte anterior. Histologicamente, os autores descreveram inflamação de intensidade variável no decorrer do período de observação e caracterizada pela infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos em diferentes períodos de observação, além de formas císticas e trofozoíticas.

A resposta celular à CA, também foi estudada em ratos, evidenciando-se que o perfil celular variava de neutrófilos no primeiro dia, para aumento gradativo da predominância de macrófagos até o 7º dia, associados à linfócitos T (LARKIN; EASTY, 1991). Badenoch *et al* (1990) também descreveram, além dos resultados supracitados, neovascularização periférica, micro abscessos e hipópio. Contudo, em seu estudo, utilizou a coinfeção com *Corynebacterium*, o que pode explicar a maior gravidade aparente das lesões.

Outro estudo utilizando ratos como modelo de CA foi o de Polat *et al* (2007), que avaliou a dinâmica do processo inflamatório após inoculação intraestromal de trofozoítos obtendo achados semelhantes aos de Larkin e Easty (1991). Os autores ressaltam que ratos permitem a avaliação clínica e histológica da CA, independente da imunossupressão por corticoides.

O hamster chinês também tem sido usado como modelo de CA. Nos estudos de Van Klink *et al* (1993), não foi possível produzir a infecção por inoculação intraestromal e injeção intraconjuntival, deposição no fundo de saco conjuntival ou a aplicação tópica em superfície corneana, ainda que esta estivesse lesada. Contudo, esse modelo foi eficiente no desenvolvimento da doença após aplicação de lente de contato carregada com amebas, a uma superfície lesada. É um modelo que retrata bem a situação entre os humanos, que é a ocorrência de micro lesões da córnea causadas pelo uso de lentes de contato. Cabe ressaltar que as lesões clínicas e histológicas observadas foram semelhantes àquelas descritas por Larkin; Easty (1991), embora haja o relato de predominância de infiltrado neutrofílico neste modelo (VAN KLINK *et al.*, 1993).

A ceratite por *Acanthamoeba* induzida por lente de contato carregada com amebas em modelo suíno foi bem-sucedida conforme estudo de HE *et al* (1992). Esses autores demonstraram infiltrados característicos em forma de anel, microcistos epiteliais e adelgaçamento estromal com alargamento aquoso e precipitado ceratíticos e ocorrência de neovascularização. As características clínicas e histopatológicas foram similares à infecção em humanos, porém observou-se a característica de autolimitação da infecção associada com cicatrização residual.

Em coelhos, a indução de CA mostrou-se ineficiente pela utilização das lentes de contato contaminadas (HE *et al.*, 1992). Contudo, Font *et al* (1991, 1992) e Cote *et al* (1991) relatam sucesso após inoculação intraestromal direta de *A. castellanii*.

Visando estabelecer modelos animais mais versáteis, de baixo custo e fácil manipulação, Ren e Wu (2010) avaliaram as vantagens, limites e faixa de adaptação de cada método de indução da CA. Após análises clínica, laboratorial e anatomopatológica e comparação entre ratos e camundongos, os autores demonstraram que ratos são os modelos de preferência devido à baixa taxa de mortalidade e córneas maiores para inoculação. Quanto a métodos de infecção, a utilização de lente de contato contaminada induziu lesões de forma moderada, enquanto que a inoculação intraestromal foi o mais eficaz para este modelo (REN; WU, 2010).

A literatura mostra estudos que utilizam somente grupos e genótipos capazes de causar CA, como *Acanthamoeba* do genótipo T4 ou previamente isoladas de casos clínicos. A capacidade de amostras de outros grupos e genótipos em causar CA não tem sido investigada. Nesse sentido, é importante conhecer o potencial de cepas de outros grupos e genótipos, que não grupo II/genótipo T4, em causar CA. Nesse trabalho, pretende-se realizar uma avaliação comparativa entre grupos e genótipos distintos de *Acanthamoeba*, em relação à sua capacidade de causar ceratite amebiana em modelo animal. Abordagens histológicas e histoquímicas foram incluídas nas análises, para investigar possíveis diferenças no padrão de desenvolvimento das infecções. Adicionalmente, propôs-se realizar essa comparação com um teste *in vitro*, a eritrofagocitose, raramente testada para *Acanthamoeba*.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Comparar *Acanthamoeba* pertencente a três grupos e genótipos distintos por meio de testes de avaliação de patogenicidade *in vitro* e *in vivo*.

5.2 Específicos

- Avaliar e quantificar a capacidade de *Acanthamoeba* de realizar eritrofagocitose *in vitro*;
- Avaliar a infectividade e o grau macroscópico de ceratite amebiana em ratos inoculados por via intraestromal com trofozoítos de *Acanthamoeba*;
- Avaliar qualitativamente as lesões de córnea por técnica histológica;
- Avaliar a presença de trofozoítos e de antígenos de *Acanthamoeba* “*in situ*” por técnica imuno-histoquímica.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Cultivo de *Acanthamoeba*

Três isolados utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos pela Prof^a. Dra. Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde. Dois isolados foram obtidos de raspado de córnea de paciente com ceratite, Vitória-ES, Brasil (Krt2 grupo II, genótipo T4, Krt16-PEN, grupo III genótipo T5, nesse trabalho designada apenas como PEN). O terceiro isolado foi obtido do ambiente (solo) Vitória-ES, Brasil (SoA1 grupo I, genótipo T17). Todas as culturas foram inicialmente mantidas em meio NNA (Ágar não nutriente), (**Anexo I**) contendo *Escherichia coli* inativada por calor, clonadas para obtenção de população homogênea e caracterização quanto à osmotolerância e termotolerância, conforme estudo anterior (POSSAMAI *et al.*, 2018). Essas culturas também foram axenizadas e avaliadas quanto à capacidade de causar efeito citopático em células MDCK (POSSAMAI *et al.*, 2018) (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Origem e características fisiológicas de isolados de *Acanthamoeba*

Cepa ^(a)	Origem	Grupo Morfológico/ Genótipo	Termo- tolerância ^(b)		Osmo- tolerância ^(b)	CPE ^(c)
			37° C	40° C	1 M	
Krt2	Caso de ceratite Vitória-ES, Brasil	II/T4	+++	+	-	+
PEN	Caso de ceratite Vitória-ES, Brasil	III/T5	+++	+++	-	+++
SoA1	Solo, Vitória-ES, Brasil	I/T17	+++	-	-	+++
Krt2 + <i>E.coli</i> Irrad	Krt2 axênica + <i>Escherichia coli</i> gama-irradiada	II/T4	na	na	na	na

a. Culturas mantidas em meio PYG

b. Testes realizados em meio NNA com *Escherichia coli*. Avaliação de crescimento: (-) sem crescimento, (+) crescimento até 1 cm da linha externa da área central, (++) crescimento de 1 a 2 cm da área central, (+++) crescimento acima de 2 cm da área central

c. Teste de efeito citopático sobre células MDCK, realizado com culturas axênicas em meio PYG. Avaliação da destruição em monocamadas: (-) sem CPE, (+) CPE com até 10% de destruição, (++) CPE com 10 a 50% de destruição, (+++) CPE com 50 a 100% de destruição

NA: não se aplica

Fonte: Adaptado de POSSAMAI *et al* (2018), p. 1390, 1396.

Cada uma dessas culturas mantidas em meio NNA foi axenizada novamente no laboratório de Parasitologia Clínica da UFMG, a fim de obter culturas axênicas recentes, para evitar possibilidade de perda de características de patogenicidade por cultivo axênico prolongado. Para a axenização, as culturas foram mantidas em NNA por mais de 72 horas, até a formação predominante de cistos. Os cistos foram recuperados e lavados 3 vezes por centrifugação (300 x g, 10 minutos) em salina de Page (**Anexo I**) e submetidos a tratamento com 625 µg/mL de enrofloxacina (Baytril®-Bayer) e 10 µg/mL amicacina (Lab. Neo. Quím. Com. e Ind. LTDA), (volume final 5 mL) por 24 horas. Após esse período, os cistos foram novamente lavados em salina de Page para remoção do excesso de antibióticos e transferidos a meio PYG (meio de cultura proteose-peptona, extrato de levedo e glicose) suplementado com 10% de soro bovino fetal), (**Anexo I**) contendo 5 µg/mL de enrofloxacina (ROWBOTHAM, 1980).

Outra amostra utilizada nos experimentos foi a cultura Krt2 associada a bactérias (*Escherichia coli*) inativadas por radiação. A cultura axenizada foi cultivada durante duas semanas, em 4 repiques, com bactérias *Escherichia coli* inativadas a 10.000 Gy por duas horas, vinte sete minutos e cinquenta e oito segundos no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) da UFMG. Para cada repique, 5×10^5 amebas foram transferidas para meio novo adicionado de $2,5 \times 10^7$ bactérias (proporção 1:50).

6.2 Eritrofagocitose

A eritrofagocitose foi avaliada conforme descrito por outros autores. Trofozoítos de cepas de *Acanthamoeba* Krt2, PEN, SoA1 e Krt2 + *E. coli* foram contados e ajustados para uma concentração de 1×10^6 trofozoítos/mL em PBS pH 7,2 em triplicata. Os eritrócitos humanos adquiridos ID-DiaCell ABO / A1-A2-B- DiaMed foram contados e ajustados em PBS à concentração de 1×10^8 eritrócitos/mL, correspondendo a relação de 100 eritrócitos/ameba.

Incubou-se 0,4 mL de suspensão de trofozoítos (10^6 trofozoítos/mL) de distintas cepas com o mesmo volume de eritrócitos (10^8 eritrócitos/mL) por 20 minutos em estufa a 37° C.

Após este período, interrompeu-se a interação, adicionando-se 1 mL de água destilada aos tubos por 10 minutos a temperatura ambiente para romper os eritrócitos livres e aderidos à superfície da ameba. Após fixação em glutaraldeído e coloração pelo Diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) as lâminas foram examinadas em microscópio óptico. Foram contadas aleatoriamente 100 trofozoítos e, para aquelas que realizaram a eritrofagocitose, também foram contados os eritrócitos por ameba. O resultado foi expresso como média e desvio padrão e também através da porcentagem de amebas que fagocitaram. O número de trofozoítos que fagocitaram bem como o número de eritrócitos fagocitados por trofozoíto foram identificados como não paramétricos pelos testes de Shapiro Wilk e Kolmogorov-Smirnov (TRISSEL *et al.*, 1978; MORA-GALINDO; GUTIERREZ-LOZANO; ANAYA-VELAZQUEZ, 1997). Assim, os resultados foram submetidos à análise de comparação de múltiplas amostras pelo teste de Kruskal Wallis, utilizando o software GraphPad Prism versão 7,0 (GraphPad software, La Jolla California USA). Adotou-se o nível de significância de 5% nas análises ($p < 0,05$).

6.3 Indução de ceratite por *Acanthamoeba* em modelo animal

Foram utilizados no experimento 45 ratos Wistar (machos), de 45 dias de idade, pesando aproximadamente 180 g, obtidos do Biotério da Faculdade de Farmácia, divididos em 5 grupos de 9 animais cada. Os ratos foram alojados no Biotério da Faculdade de Farmácia/UFMG e foram mantidos em gaiolas coletivas, com temperatura ambiente de 23°C e exposição à luz durante 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da Universidade Federal de Minas Gerais (nº do certificado 23075.087228/2009-74) de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), os experimentos foram realizados em modelo já mencionado com inoculação via estromal, conforme proposto por Ren e Wu (2010), com modificação.

Três grupos de animais foram inoculados por via intraestromal com trofozoítos das três cepas axenizadas de *Acanthamoeba* (Krt2, PEN e SoA1). Um quarto grupo foi inoculado com a cepa Krt2 associada com *E. coli* inativada por radiação e o quinto grupo foi inoculado para uma concentração $1,5 \times 10^5$ *E. coli* inativada por radiação/mL somente. As culturas de amebas em fase de crescimento exponencial

(48-72 h) foram lavadas em salina de Page (**Anexo I**), por 3 vezes por centrifugação (300 x g, 10 minutos) contadas em câmara de Neubauer e acertadas para a concentração $2,5 \times 10^4$ amebas/mL. Na cultura associada a *E.coli* inativada, foi feita tanto a contagem de amebas quanto a contagem de bactérias, pois um inóculo correspondente em bactérias *E. coli* inativadas remanescentes foi usado para inoculação de um grupo controle de ratos.

Os animais foram anestesiados com 80 mg/Kg de cloridrato de cetamina e 10 mg/Kg de xilazina por via intraperitoneal e com uso tópico de lidocaína a 2% na superfície ocular. O procedimento foi realizado sob uma lupa, utilizando uma seringa de 10 microlitros e uma agulha 31G.

No olho direito de cada animal foi inoculado 2 μ L de suspensão contendo $2,5 \times 10^4$ amebas correspondentes aos seus devidos grupos. No olho esquerdo foi aplicado 2 μ L de PBS (tampão fosfato) como controle negativo. No grupo controle (grupo 5) foi utilizado também inóculo de 2 μ L, contendo um total de $1,5 \times 10^5$ bactérias, quantidade correspondente ao quantificada em Câmara de Neubauer junto com as amebas na amostra inoculada de Krt2 + *E.coli*.

Todas as córneas dos animais foram examinadas anteriormente a inoculação para excluir qualquer anormalidade.

6.4 Avaliação da infectividade e do grau macroscópico da ceratite

Os animais foram observados diariamente e no 7º dia, avaliados quanto à presença e grau de lesão conforme proposto por Ren e Wu (2010), com adaptação como a seguir: Grau 0: Córnea com aspecto normal ou ponto de cicatrização; Grau 1: Área de opacidade da córnea limitado à região de inóculo, até 1 mm diâmetro; Grau 2: Área de opacidade da córnea > 1 mm de diâmetro, nitidamente ultrapassando o ponto inicial do inóculo, ocupando até 50% da córnea; Grau 3: Área de opacidade da córnea ocupando 50% ou mais.

Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia com o triplo da dose de anestésicos (240mg/Kg de cloridrato de cetamina e 30mg/Kg de xilazina). O olho esquerdo (controle aplicado com PBS) e direito (trofozoíto ou bactérias) foram removidos e transferidos a um frasco com formol a 10% pH 7,2 em tampão fosfato.

Em cada grupo foi determinada a média ponderada do grau de lesão, calculada pela somatória do número de animais com lesão multiplicada pelo grau respectivo, dividindo pelo total de animais ($n = 9$).

6.5 Avaliação histopatológica

Os olhos fixados em formol a 10% p H 7,2 em tampão fosfato foram desidratados em soluções alcoólicas de concentrações crescentes, diafanizados em xilol, incluídos em parafina, seccionados com 4 μm de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). Todos os cortes histológicos foram avaliados em microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) e as imagens digitalizadas com a microcâmara acoplada QColor3 Olympus (Tokyo, Japan), no laboratório de Protozooses do Depto. de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

6.6 Produção de anticorpos policlonais anti-*Acanthamoeba*

Com o objetivo de padronizar reação imunocitoquímica e imuno-histoquímica anti-*Acanthamoeba*, trofozoítos foram obtidos a partir de crescimento exponencial (48 a 72 h) da cepa de *Acanthamoeba* ALX de genótipo T4/grupo II, mantida a 32° C, em garrafas de 25 cm³ contendo 10 mL de meio PYG.

Os trofozoítos foram contados em Câmara de Neubauer, ajustados para uma concentração final de 2×10^7 amebas/mL em solução salina estéril de Page (**Anexo I**). Um total de 2×10^7 trofozoítos foram recuperados de culturas por centrifugação (2000 rpm) e lavagem sequencial em salina de Page por 3 vezes. O sedimento foi suspenso em 2 mL de PBS pH 7,2.

O antígeno bruto foi produzido por sonicação, usando esquema de 5 pulsos de 99 watts de 1 minuto com intervalos de 60 segundos. Dois ratos Wistar foram utilizados para imunização, a primeira imunização foi realizada por via intraperitoneal com 200 μL do antígeno bruto de 2×10^7 trofozoítos sonicados. A segunda imunização foi realizada 15 dias após a primeira por via subcutânea, com 100 μL de antígeno acrescido de 100 μL de adjuvante incompleto de Freund. Uma terceira imunização foi realizada 15 dias após a segunda, seguindo a mesma orientação da segunda imunização, porém foi utilizado adjuvante completo de Freud.

Após dez dias da última imunização, os ratos foram submetidos à eutanásia com o triplo da dose de anestésicos (240mg/Kg de cloridrato de cetamina e 30mg/Kg de xilazina) e submetidos à sangria total por punção cardíaca. Após coletado, o sangue foi centrifugado 600 g por 10 minutos para obtenção de soro imune. Em seguida o soro foi aliquoteado e armazenado em freezer - 20° C. Procedimento de imunização e escolha do adjuvante de Freund foi realizado com base nos resultados obtidos na literatura com respeito à produção de anticorpos anti-*Acanthamoeba* (WALOCHNIC *et al.*, 2004).

6.7 Reação imunocitoquímica anti-*Acanthamoeba*

A qualidade e reatividade do soro foram validadas por reação de imunocitoquímica, onde amostras de trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* foram fixados em lâminas histológicas seguindo o mesmo protocolo descrito na literatura com algumas modificações e utilizadas como controles positivos da reação (O'HARA; GARDNER; BENNETT, 1980). As lâminas foram obtidas separadamente com esfregaço das culturas, na concentração 500 trofozoítos/mL de *Acanthamoeba* pertencentes às cepas Krt2, PEN e SoA1. Posteriormente as lâminas foram fixadas em álcool 90% em temperatura ambiente, por um período de 72 horas. Passado este período as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,2) por 5 min, e a atividade endógena da peroxidase foi eliminada pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 0,2% (H₂O₂) por 20 min. Os sítios de ligações inespecíficos foram bloqueados incubando-se os cortes em câmara úmida com a solução de bloqueio "Animal-Free Blocker" (Vector Laboratories, Burlingame, USA) durante 1 hora a 4° C. As lâminas foram incubadas por 18 horas a 8°C com anticorpo policlonal anti-*Acanthamoeba*, diluído em albumina do soro bovino (BSA) 5% na concentração 1: 1000. Em seguida as lâminas foram lavadas em PBS; pH 7,2 por 5 min e posteriormente incubadas em temperatura ambiente com IgG de cabra anti-rato biotilado e estreptavidina ambos diluídos em BSA 5% na concentração 1:100 por 1 hora (Zymed Laboratories, São Francisco, CA, EUA). A reação foi revelada usando uma solução de diaminobenzidina a 0,05% e H₂O₂ a 0,2% e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris diluída 1:2. Para o controle negativo da reação, o anticorpo primário foi substituído por PBS nas reações em lâminas ricas em trofozoítos de *Acanthamoeba*. Ao termino da reação, as lâminas foram desidratadas em soluções alcoólicas crescentes e diafanizadas em

xilol e montadas com entelan. As lâminas com as reações positivas foram levadas ao microscópio óptico e os trofozoítos marcados foram visualizados pelos tons de marrom conferido pelo cromógeno diaminobenzidina, confirmando a reatividade do anticorpo policlonal anti-*Acanthamoeba*.

6.8 Reação imuno-histoquímica anti-*Acanthamoeba*

Os cortes para processamento em imuno-histoquímica seguindo o mesmo protocolo descrito para imunocitoquímica foram desparafinados em xilol, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em PBS pH 7,2. A atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando os cortes em solução de H₂O₂ 40 (v/v) a 0,2% em 200 mL de PBS por 20 minutos e os sítios de ligações inespecíficos foram bloqueados incubando-se os cortes em câmara úmida com a solução de bloqueio "Animal-Free Blocker" (Vector Laboratories, Burlingame, USA) durante 1 hora a 4° C. Os cortes foram incubados com soro policlonal anti-*Acanthamoeba* diluído 1:1000 (produzido no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Farmácia/UFMG e testado no laboratório de Protozooses do Depto. de Patologia Geral do ICB/UFMG). Em seguida, os cortes foram incubados com IgG biotinizada diluída 1:200 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA) e estreptavidina conjugada com peroxidase (Zymed-Laboratories Inc., San Francisco, USA) também 1:200, por 1 hora cada.

A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 40 (v/v) a 0,2%. Como controles positivos foram usados cortes histológicos de fígado obtidos de lesões ricas em trofozoítos de *E. histolytica*, a título de conferência da metodologia. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por PBS em alguns destes cortes. Todos os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Harris por 2 segundos, hidratados e diafanizados para montagem em entelan e analisados no mesmo microscópio.

7. RESULTADOS

7.1 Eritrofagocitose

A percentagem de amebas que fagocitaram eritrócitos nas diferentes amostras variou de 0,33 a 25,3% (**Tabela 2**). A cepa que apresentou significativamente maior taxa de eritrofagocitose entre as mostras foi a Krt2 25,3% \pm 3,9 ($p < 0,05$). Sua correspondente associada a bactérias irradiadas Krt2 + *E. coli* fagocitou significativamente menos eritrócitos (11,3% \pm 2,1) (**Figura 7**). As demais cepas PEN e SoA1 também apresentaram valor de eritrofagocitose significativamente menores (11,6% \pm 0,5 e 0,33%, \pm 0,5 respectivamente) em relação a Krt2 (**Tabela 2, Figura 6**).

O número de eritrócitos fagocitados pelas amebas foi de 1 a 6 (**Figura 6**). Quando avaliada a média de eritrócitos fagocitados por ameba, considerando inclusive aquelas que não fagocitaram nenhum eritrócito, o valor também foi maior para Krt2 (0,29 \pm 0,06), seguida da PEN (0,19 \pm 0,05), Krt2 + *E.coli* irradiada (0,14 \pm 0,02) e SoA1 (0,01 \pm 0,02) (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Fagocitose de eritrócitos humanos por trofozoítos de *Acanthamoeba* pertencentes a três grupos e genótipos distintos

Cepas ^a	Grupo/ Genótipo	% total de eritrofagocitose	M \pm DP eritrócitos/ameba ^b
Krt2	II/T4	25,3 \pm 3,9 ***	0,29 \pm 0,06
PEN	III/T5	11,6 \pm 0,5 **	0,19 \pm 0,05
SoA1	I/T17	0,33 \pm 0,5 *	0,01 \pm 0,02
Krt2 + <i>E.coli</i> Irrad	II/T4	11,3 \pm 2,1 **	0,14 \pm 0,02

a. Culturas axênicas em meio PYG com 10% de soro bovino fetal. Krt2 + *E. coli* Irrad representa a cepa previamente associada a *Escherichia coli* inativada por radiação (10000 Gy) por 4 repiques.

b. Média e desvio padrão do número de eritrócitos fagocitados, considerando a população total de trofozoítos analisados.

(*), (**), (***) : Diferenças significativas na percentagem de eritrofagocitose ($p < 0,05$), teste Kurskal-Wallis indicados pelos asteriscos.

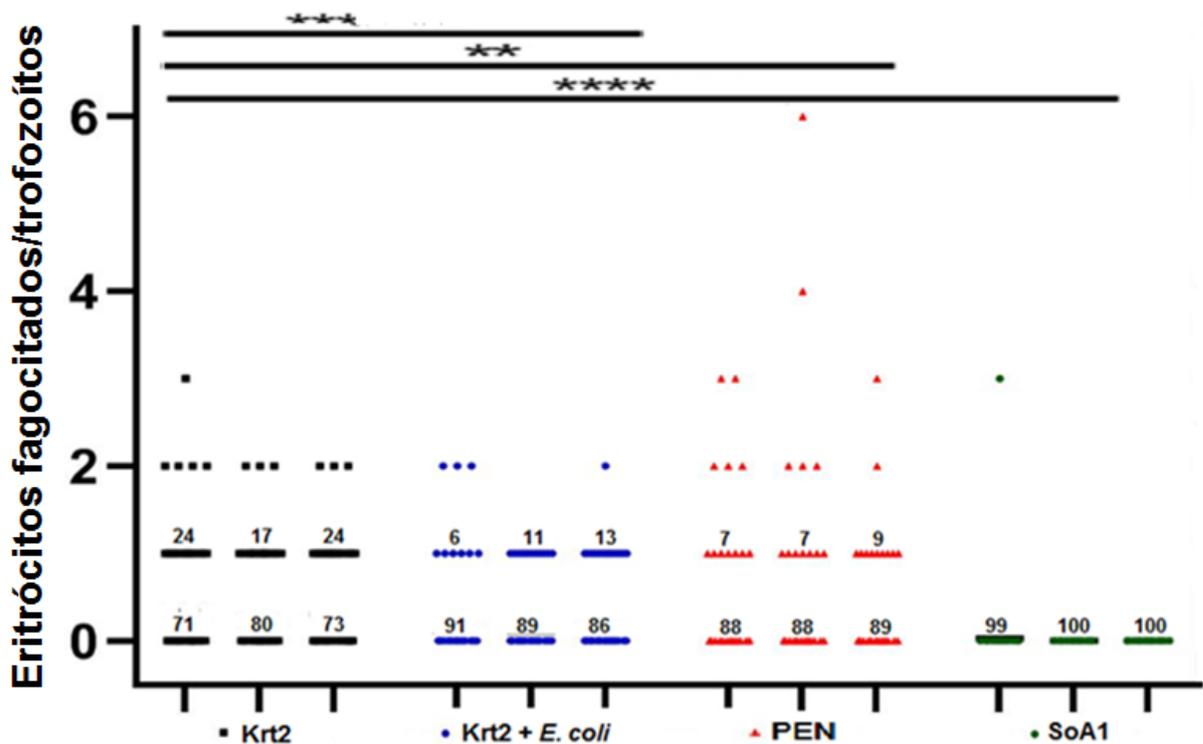


Figura 6 - Número de trofozoítos das cepas Krt2, Krt2 + *E. coli*, PEN e SoA1 de *Acanthamoeba* que realizaram eritrofagocitose e número de hemácias fagocitadas por trofozoízo. Valores representativos das replicatas. Os dados são apresentados pelo teste Kruskal-Wallis.

7.2 Infectividade e grau macroscópico da ceratite induzida em ratos

Ao avaliar as córneas de ratos inoculados com a cepa SoA1, foram observadas lesões em 2 ratos (22%) (**Tabela 3**). Um deles apresentou opacidade focal da córnea limitada à região de inóculo, medindo cerca de 1 mm diâmetro caracterizando lesão de grau 1, e outro, lesão de grau 3, ocupando mais de 75% da córnea, caracterizada por extensa zona de opacidade da córnea com uma área central de necrose (**Figura 7**). A cepa Krt2 associada ou não a *E. coli* irradiada, bem como a cepa PEN, não induziram lesões. Nos animais inoculados com essas cepas, os olhos apresentaram aspecto normal ou com pequenas alterações da córnea, com úlcera superficial no ponto do inóculo, similares ao observados em alguns animais controle, aplicados somente com PBS ou inoculado somente com *E. coli* irradiada (**Figura 7**).

Tabela 3 - Infectividade e grau de infecção de *Acanthamoeba* ($2,5 \times 10^4$ trofozoítos) após inoculação intraestromal em córnea de ratos Wistar

Cepas ^a	Grupo/ Genótipo	Infectividade		Grau de infecção ^b				
		Lesão/Total (n=9)	%	0	1	2	3	M
Krt2	II/T4	0/9	0	9	0	0	0	0
PEN	III/T5	0/9	0	9	0	0	0	0
SoA1	I/T17	2/9	22	7	1	0	1	0,44 ^c
Krt2 + <i>E.coli</i> Irrad	II/T4	0/9	0	0	0	0	0	0
<i>E.coli</i> Irrad	na	0/9	0	0	0	0	0	0

A. Culturas axênicas em meio PYG com 10% de soro bovino fetal. Krt2 + *E. coli* irradiada representa uma das cepas previamente associada a *Escherichia coli* inativada por radiação (10000 Gy) na proporção ameba/bactérias de 1:50, por 4 repiques. **B.** Grau lesão 0. Córnea com aspecto normal ou ponto de cicatrização; **1.** Área de opacidade da córnea limitado à região de inóculo, até 1 mm diâmetro; **2.** Área de opacidade da córnea > 1 mm, ocupando até 50% da córnea; **3.** Área de opacidade da córnea ocupando 50% ou mais da córnea. Controles aplicados com PBS não desenvolveram lesões. **C.** Média ponderada do grau de infecção.

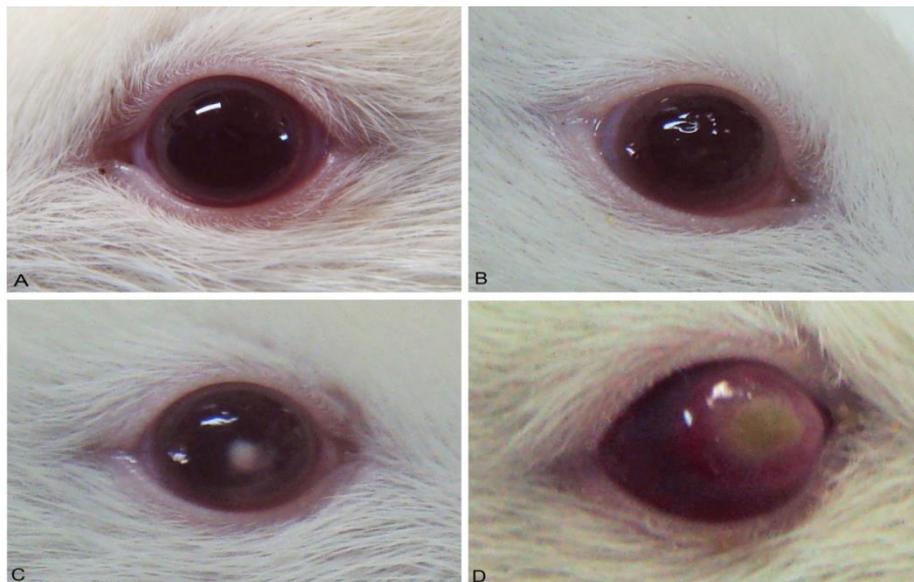


Figura 7 - Ceratite por *Acanthamoeba* induzida em ratos Wistar por inoculação intraestromal de $2,5 \times 10^4$ trofozoítos em cultivo axênico e eutanasiado após 7 dias. A. Olho esquerdo de rato aplicado com PBS, com aspecto macroscópico normal. **B.** Olho direito

7.3 Avaliação histopatológica

Cortes histológicos corados em HE, obtidos a partir dos olhos direito e esquerdo, foram utilizados para a histopatologia. O olho esquerdo dos ratos de todos os grupos mostrou-se com aspecto aparentemente normal, sem processo inflamatório ou outros tipos de lesões significativas (**Figuras 8 e 9 - Anexo II**). Nestes ratos, apenas eventualmente foi observada aglomeração focal de número muito reduzido de células inflamatórias no estroma corneal, provavelmente devido ao traumatismo provocado pela introdução da agulha para aplicação do PBS (Dados não mostrados).

Já no olho direito de dois ratos do grupo inoculado com a cepa SoA1, foram encontradas lesões significativas que caracterizaram uma ceratite aguda por *Acanthamoeba*. No rato com lesão de grau 3 foi observada a presença de uma úlcera corneana composta por zona central de necrose, onde houve o desaparecimento total do epitélio corneal e da camada de Bowman, delimitada por epitélio pavimentoso necrosado em uma borda e, pelo mesmo epitélio não-necrosado em outra (**Figura 10 A - Anexo II**). A porção central da necrose era constituída por grande quantidade de debris celulares e por fibrina depositada, margeada por abundante tecido de granulação (**Figura 10 B - Anexo II**). Neutrófilos e macrófagos de permeio estavam presentes em diferentes áreas da úlcera (**Figura 10 C - Anexo II**).

O corpo ciliar, músculo ciliar e a íris também foram acometidos pelo processo inflamatório. Neutrófilos e macrófagos foram observados nestas três estruturas, em maior intensidade na segunda delas e associado a uma perda de células musculares lisas (**Figuras 11 B, C - Anexo II**). No corpo ciliar e na íris também foi observado edema, hemorragia e descamação celular (**Figura 11 A - Anexo II**). Além disso, neutrófilos, hemácias e células descamadas foram encontrados na câmara anterior (**Figura 11 A - Anexo II**). Em conjunto, tais alterações caracterizaram a presença de uma uveíte anterior.

Também foi observada a presença de uma esclerite, caracterizada por infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, macrófagos e linfócitos, associado à edema e neoformação vascular (**Figura 11 D - Anexo II**).

Já no rato com grau de lesão 1, essas ficaram restritas à córnea, sendo constituídos por discreto infiltrado inflamatório presentes no estroma corneal, constituídas principalmente por neutrófilos e macrófagos e, edema intenso (Dados não mostrados). Nos demais ratos inoculados com a cepa SoA1 e com as outras cepas não foram observadas lesões.

7.4 Avaliação da reatividade dos anticorpos policlonais anti-*Acanthamoeba* por imunocitoquímica

Após a imunização de um rato com antígeno bruto de *Acanthamoeba* e a obtenção do soro imune, diferentes diluições do mesmo, bem como do anticorpo 2º e da estreptavidina, foram testados em trofozoítos aderidos às lâminas histológicas por meio de uma reação imunocitoquímica. Nos esfregaços onde foi adicionado o soro policlonal anti-*Acanthamoeba* detectou-se a presença de coloração marrom dada pelo cromógeno diaminobenzidina em todos os trofozoítos (**Figura 12 B - Anexo II**). As observações de reações positivas confirmaram a capacidade do soro policlonal em reconhecer e ligar-se aos trofozoítos de *Acanthamoeba*. A substituição do soro policlonal por solução de PBS produziu reação negativa, comprovada pela observação de todos os trofozoítos com ausência de coloração marrom (**Figura 12 A - Anexo II**).

7.5 Padronização e avaliação imuno-histoquímica

O mesmo soro policlonal anti-*Acanthamoeba* foi testado no olho direito dos dois ratos inoculados com a cepa SoA1 que apresentaram lesões, utilizando diferentes diluições dos anticorpos 1º, 2º e da estreptavidina. Marcações positivas foram observadas em ambos os ratos. Tais marcações foram caracterizadas pela presença de material de aspecto granuloso e de coloração marrom em muitas áreas do estroma corneal, tanto no meio extracelular quanto no interior de células do infiltrado inflamatório, comprovando a presença de antígenos de *Acanthamoeba*, provavelmente derivados de trofozoítos destruídos (**Figuras 12 E, F - Anexo II**). Um trofozoíto imunomarcado foi encontrado no estroma corneal do rato com lesão de grau 3 (**Figura 12 F - Anexo II**). A substituição do soro policlonal por solução de PBS produziu reação negativa, comprovada pela ausência de coloração marrom em toda a extensão dos cortes histológicos (**Figuras 12 C, D - Anexo II**).

8 DISCUSSÃO

A variação do potencial patogênico de *Acanthamoeba* tem sido estudada há bastante tempo. Estudos *in vitro* com diferentes isolados foram descritos, mostrando que há diferenças genéticas, mas também no comportamento biológico de amostras de amebas (BOGLER *et al.*, 1983; DA ROCHA-AZEVEDO; SILVA-FILHO, 2007; POSSAMAI *et al.*, 2018). De modo geral, cepas isoladas de casos clínicos, tanto de ceratite quanto de encefalite, são consideradas como de maior patogenicidade (ROCHA-AZEVEDO; SILVA-FILHO, 2007; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015). Testes *in vitro* indicando tolerância à temperatura e osmolaridade mais altas, efeito citopático e outros, segundo esses autores, refletem maior potencial patogênico e propensão a causar infecções.

No presente trabalho, foi proposta a avaliação da eritrofagocitose por trofozoítos de *Acanthamoeba*, buscando determinar se o processo poderia ser observado nos diferentes grupos/genótipos e uma possível correlação com indicadores de patogenicidade dessas amostras. Cabe ressaltar que o teste de eritrofagocitose é pouco descrito para estabelecer a patogenicidade do gênero *Acanthamoeba*, ao contrário dos outros parâmetros fisiológicos. No entanto, foi bastante empregado para a ameba intestinal *E. histolytica*, cujas cepas virulentas apresentam altos índices de eritrofagocitose em torno de 60 a 95%. A média de eritrócitos/amebas em *E. histolytica* é em torno de 10 a 20, indicando uma alta capacidade fagocítica dessa espécie (GOMES *et al.*, 1997; TALAMÁS-LARA *et al.*, 2014). As amebas captam e fagocitam naturalmente, como fontes alimentares, muitas células vivas, como bactérias, algas e leveduras, bem como células de mamíferos (DE JONCKHEERE, 1980; NACAPUNCHAI *et al.*, 2004). Em um estudo realizado por Martínez-Castillo *et al.* (2015) foi sugerido que amebas de vida livre degradam proteínas ligantes do ferro. Esses autores levantaram a hipótese de que a ameba anifzóica *N. fowleri* depende do ferro para sobreviver e proliferar durante a Meningoencefalite Amebiana Primária (PAM). Estudo realizado por Shibayama e colaboradores para determinar o possível papel da eritrofagocitose na patologia de isolados de *Acanthamoeba* mostrou que os índices fagocíticos de *A. castellanii* e *A. polyphaga* variaram em torno de 5% e 15%, respectivamente. Os autores sugeriram que o processo eritrofagocítico não constitui um mecanismo relevante na patogênese de *Acanthamoeba spp* (SHIBAYAMA *et al.*, 2005). No entanto, os dados do presente trabalho indicam que, mesmo com baixo

índice de eritrofagocitose, a cepa Krt2 obtida de caso de ceratite e de genótipo T4 apresentou maior capacidade de fagocitose. Em contraste, a cepa SoA1, de origem ambiental e de grupo morfológico e genótipo menos associado a infecção (I,T17) apresentou índice fagocítico mínimo. Esses dados sugerem uma associação de maior eritrofagocitose com grupos e genótipos mais propensos a causar a infecção, porém mais estudos, com um número maior de amostras, seria necessário para confirmar essa hipótese no caso de *Acanthamoeba*.

Com relação à cepa Krt2 associada a bactérias irradiadas, houve menor índice de eritrofagocitose comparado à cultura original. Uma possível explicação seria que a capacidade de fagocitar estivesse direcionada às bactérias associadas, diminuindo assim sua afinidade para captar os eritrócitos.

Além de avaliar a eritrofagocitose das três cepas de *Acanthamoeba*, propôs-se testá-las em modelo animal de CA, escolhendo-se o modelo rato Wistar e a via de inoculação intraestromal com base em trabalho anterior que indicou ser essa a melhor condição de indução de lesões (REN; WU, 2010).

Nesse trabalho, as amostras usadas induziram, de forma geral, nenhuma ou baixa percentagem de lesão. Para excluir a possibilidade de o cultivo axênico prolongado levar a uma atenuação da virulência, o que já foi relatado para cepas de *Acanthamoeba* por alguns autores (MAZUR; HADAS, 1994, KOHSLER *et al.*, 2008; VERÍSSIMO *et al.*, 2013), as amostras foram utilizadas para infecção experimental com pouco tempo após axenização, com no máximo cinco repiques. Duas delas, Krt2 e a PEN, foram obtidas a partir de amostra clínica de pacientes com lesões ativas, pertencendo a genótipos associados a maior patogenicidade, como o T4 (Krt2), que é o principal envolvido em casos clínicos (MACIVER *et al.*, 2013) e, T5 (PEN), um genótipo menos comum em infecções, mas com tendência a patogenicidade (WALOCHNIK *et al.*, 2000; CARLESSO *et al.*, 2014). Além disso, essas amostras apresentaram citopatogenicidade leve (Krt2) a intensa (PEN) para células MDCK (POSSAMAI *et al.*, 2018). Apesar da origem clínica e dos testes *in vitro* indicando patogenicidade, essas duas cepas não induziram lesões em córnea do modelo animal, nas condições testadas nesse trabalho. Ressalta-se ainda, que durante o acompanhamento desses animais no período pós-inoculação, não houve desenvolvimento de lesões visíveis, que poderiam indicar uma regressão em prazo menor que 7 dias, quando foram submetidos a eutanásia.

Em uma tentativa de induzir a expressão de patogenicidade da cultura axênica, foi realizada a associação dos trofozoítos da cepa Krt2 com bactérias por quatro repiques sucessivos. Optou-se por utilizar *Escherichia coli* irradiada com base em trabalho prévio que indicou aumento de virulência de *E. histolytica* axênica associada a bactérias letalmente irradiadas (WITTNER; ROSENBAUM, 1970). Além disso, a capacidade de *Acanthamoeba* induzir lesões está associada ao contato com proteínas manosiladas na superfície ocular que estimulam a produção da protease, de 133 kDa (ALIZADEH *et al.*, 2005), sendo que as bactérias, como a da microbiota ocular *Corynebacterium xerose*, também expressam essas proteínas MIP133 em quantidades aumentadas, exacerbando seu comportamento patogênico *in vivo* (BADENOCH, 1990; PUECH *et al.*, 2001). No entanto, mesmo após a associação com *E. coli*, a cepa Krt2 não foi capaz de induzir lesões na córnea dos ratos. É possível que o mecanismo de estimulação de patogenicidade por bactérias deve ser distinto quando se utiliza bactérias viáveis e inviáveis.

Ao contrário dos isolados clínicos, apenas a cepa de origem ambiental SoA1, induziu lesões em dois dos nove (22%) animais. Interessantemente, essa cepa é pertencente a um grupo e genótipo raramente associado a infecções (Grupo I/genótipo T17). Conforme citado em Possamai *et al* (2018), cepas do grupo I eram consideradas não patogênicas, porém, estudos recentes indicaram casos de infecções por genótipos pertencentes a esse grupo morfológico. Corroborando com essa informação, apenas um relato de caso foi descrito com infecção pelo genótipo T17, tratando-se de um paciente pós-transplantado de pulmão que evoluiu para uma grave encefalite amebiana (D'AURIA *et al.*, 2012). Assim, a indução de lesão de córnea em rato no presente trabalho, mesmo que em baixa frequência e intensidade, indica que *Acanthamoeba* grupo I/T17 pode ser um patógeno capaz também de induzir infecções de córnea.

De forma geral, a baixa taxa de infecção em córnea de rato nas condições desse trabalho foi inesperada considerando a origem clínica de duas das culturas. No estudo de Ren e Wu (2010), o inóculo usado foi de 2000 trofozoítos, obtendo-se um índice de 100% de infecção, a maioria dos animais (9 de n=10) apresentando lesões de maior gravidade. No presente estudo, foi usado um inóculo cerca de 10 vezes maior de ($2,5 \times 10^4$) e ainda assim a infectividade foi ausente ou baixa. Cabe ressaltar que, em estudo anterior do grupo, inóculos na ordem de 10^5 amebas

induziram lesões de córnea, utilizadas para avaliação de técnica diagnóstica (COSTA *et al.*, 2017). Um aumento da quantidade de amebas, portanto, poderia induzir lesões, porém considerou-se que usar essa estratégia não refletiria a realidade das infecções reais de córnea, em que a quantidade de amebas que estabelecem a infecção certamente não chega a números tão elevados.

Uma possibilidade para explicar a baixa taxa de infecção no modelo é a resposta imunológica dos animais. Estudo realizado em hamster chinês mostrou que 30 a 40 % destes animais não desenvolveram CA, os autores indicaram que a exposição prévia à *Acanthamoeba* poderia ter resultado em imunidade (VAN KLINK *et al.*, 1993; GONZÁLEZ-ROBLES, 2014). É possível, portanto, que os ratos disponibilizados para o experimento, nas condições em que foram criados, tivessem uma resistência maior à infecção. Além disso, apesar de alguns trabalhos citarem o sucesso de infecções experimentais de córnea por via intraestromal em ratos Wistar, usando inóculos próximos aos usados nesse estudo (POLAT, 2007, REN; WU, 2010), nem sempre é possível repetir condições experimentais exatas, principalmente em relação à criação de animais. Destaca-se ainda que muitas vezes, dados relacionados a fracassos em modelos experimentais não são reportados, conforme discute Niederkorn *et al* (1999) em uma revisão sobre patogênese de *Acanthamoeba*. Somente um estudo, descrito por Van Klink *et al* (1993), indicou a impossibilidade de induzir CA experimental. Pode-se atribuir a baixa taxa de infecção a fatores ambientais e individuais que podem ter favorecido a resposta imune dos animais, tanto quanto inibido a patogenicidade do agente.

Com relação aos ratos que desenvolveram ceratite pela cepa SoA1, as lesões observadas foram semelhantes às descritas por outros autores, inclusive com o desenvolvimento de uma úlcera corneana (LARKIN; EASTY, 1990, 1991). A úlcera era constituída por significativa zona central de necrose com perda do epitélio corneal, delimitada pelo epitélio pavimentoso necrosado ou não. A presença de grande quantidade de tecido de granulação ao redor comprova que a área de necrose era mais extensa e que foi absorvida no decorrer da infecção. O processo inflamatório presente era típico de infecção causada por *Acanthamoeba* e outras estruturas adjacentes foram atingidas pelo mesmo, como a íris, corpo e músculo ciliares e esclerótica. Restos teciduais e do exsudato também foram encontrados na

câmara anterior. Nos cortes histológicos analisados não foram identificados trofozoítos ou cistos, o que indica um processo de resolução.

A dificuldade para se detectar as formas de *Acanthamoeba* está relacionada com a similaridade entre elas e demais células do corte histológico. Villani *et al* (2014) relatam que, muitas vezes, os trofozoítos presentes na lesão podem ser confundidos com leucócitos e núcleos de ceratócitos, o que dificulta detectá-los nos cortes histológicos. Assim, a marcação imuno-histoquímica é uma estratégia que facilita muito a identificação de formas infecciosas no tecido (D'AURIA, 2012; LARKIN; EASTY, 1990, 1991). A presença dos antígenos imunomarcados "*in situ*" comprovou a infecção e dá sustentação a hipótese de que a resposta imune do hospedeiro desenvolvida apresentava um grau de eficiência capaz de eliminar o parasito. Apesar de não termos encontrado cistos, detectamos a presença de um trofozoíto imunomarcado no rato portador da lesão de grau 3. De fato, embora o rato seja usado como modelo de CA, as lesões se desenvolvem, mas evoluem de forma geral para a cura (POLAT, 2007; REN; WU, 2010). Nos animais que desenvolveram a lesão, maior quantidade de formas íntegras das amebas possivelmente poderiam ser encontradas na etapa inicial da infecção.

Apesar do pequeno número de lesões observadas no modelo aqui estudado, o desenvolvimento da reação imunocitoquímica e imuno-histoquímica é uma ferramenta com perspectivas de uso em diagnóstico. O raspado de córnea é o procedimento mais comumente usado para fazer o diagnóstico parasitológico de CA, sendo usado para a cultura ou para visualização de trofozoítos ou cistos por colorações como Giemsa, azul de metileno e ainda o corante fluorescente calcofluor White (AURAN; STARR; JAKOBIEC, 1987; THOMAS, 1990; WILHELMUS *et al.*, 1986). No entanto, conforme já descrito anteriormente, pode haver dificuldades de identificar formas no raspado de córnea por se confundirem com células do hospedeiro (SHARMA *et al.*, 2001; VILLANI *et al.*, 2014). A reação imunocitoquímica poderia, portanto, facilitar a visualização do agente no material. Um trabalho anterior descreveu a utilização de anticorpos policlonais anti-*Acanthamoeba* produzidos em coelho para avaliação de técnica de imunoperoxidase (IP) em raspados de córnea com suspeita de ceratite infecciosa (SHARMA *et al.*, 2001). Nesse estudo foram observados 100% e 83% de sensibilidade da IP em relação à coloração de Calcofluor White e cultura, respectivamente. A especificidade foi de 94% e 100%,

respectivamente, considerando as duas técnicas. Os autores concluíram que a IP poderia complementar os resultados de cultura. Assim, o soro hiperimune produzido no presente trabalho poderia ser avaliado quanto à reatividade para outros patógenos da córnea e utilizado para testar o diagnóstico em raspados com suspeita de CA.

9 CONCLUSÃO

- *Acanthamoeba* é capaz de fagocitar eritrócitos humanos em baixa intensidade se comparada a outras amebas como *Entamoeba histolytica*, porém *Acanthamoeba* Krt2 de origem clínica apresentou maior capacidade de eritrofagocitose em relação aos outros grupos.
- O modelo de Ceratite por *Acanthamoeba* em ratos Wistar apresentou baixa taxa de infecção nas condições adotadas neste trabalho e a associação com bactérias irradiadas não alterou a patogenicidade *in vivo* de *Acanthamoeba*.
- A indução de ceratite pela cepa SoA1 mostrou pela primeira vez a capacidade de *Acanthamoeba* de grupo I genótipo T17 de causar infecções em córnea, indicando que linhagens desse grupo/genótipo tem o potencial de causar CA em humanos.
- Os métodos imunocitoquímico e imuno-histoquímico apresentados mostraram-se eficazes na marcação de trofozoítos e antígenos de *Acanthamoeba*, com potencial para uso diagnóstico laboratorial para CA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, M. The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. **Infect. Dis.Rev**, v. 2, p. 65 – 73, 2000.

AURAN, J. D.; STARR, M. B.; JAKOBIEC, F. A. *Acanthamoeba* keratitis: A review of literature. **Cornea**, v. 6, p. 2-26, 1987.

BADENOCH, P. R. *et al.* Pathogenicity of *Acanthamoeba* and a *Corynebacterium* in the rat cornea. **Archives of Ophthalmology**. v. 108, p. 107-112, 1990.

BOETTNER, D. R. *et al.* *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 3422-3430, 2005.

BOGLER, S. A. *et al.* Interstrain mitochondrial DNA polymorphism detected in *Acanthamoeba* by restriction endonuclease analysis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 8, p. 145-163, 1983.

BOOTON, G. C. *et al.* Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. **J Clin. Microbiol.** V.43, p. 1689–1693, 2005.

BOTTONE, E. J. *et al.* Differential binding capacity and internalization of bacterial substrates as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, p. 148-154, 1994.

BOURCIER, T.; ZAMPHIR, O.; CHAUMEIL, C. Keratites ammbiennes. **EMC Ophthalmologie**, v. 21, p. 200, 2007.

CAO, Z; JEFFERSON, D.M; PANJWANI, N. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. **J Biol Chem**, v. 273, p. 15838-15845, 1993.

CARLESSO, A. M. *et al.* Characterization of isolates of *Acanthamoeba* from the nasal mucosa and cutaneous lesions of dogs.**CurrMicrobiol**, v. 68, p. 702–707, 2014.

CARNT, N.; STAPLETON, F. Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: A review. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v. 36, n. 2, p. 77–92, 2016.

CARVALHO, F. R. *et al.* Twenty years of *Acanthamoeba* Keratitis. **Cornea**, v. 28, n. 5, p. 516-9, Jun 2009.

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

CERVA, L. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri* occurrence of antibodies in man. **J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.**, v. 33, p. 99 – 103, 1989.

CASTELLANI, A. An amoeba found in cultures of a yeast: preliminary note. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 33, p. 160, 1930.

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

CLARKE, B. *et al.* "Advances in the diagnosis and treatment of *Acanthamoeba* keratitis". **J Ophthalmol.**, p. 1-6, 2012.

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

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

CORSARO, D. *et al.* Update on *Acanthamoeba jacobsi* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. **Parasitol Res**, v. 116, p. 1273–1284, 2017.

COSTA, A. O. *et al.* Molecular diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis: evaluation in rat model and application in suspected human cases. **Parasitology Research**, v. 116, n. 4, p. 1339-1344, 2017.

COSTAS, M.; GRIFFITHS, A. The esterases and acid-phosphatases of *Acanthamoeba* (*Amoebida*, *Acanthamoebidae*). **Protistologica**, v. 20, p.33-41, 1984.

COTE, M. A. *et al.* Evaluation of the rabbit as a model of *Acanthamoeba* keratitis. **Reviews of Infectious Diseases**, p. 443-444, 1991.

CRAIG, C. F. The Etiology, Diagnosis, and Treatment of Amebiasis. **The Williams & Wilkins Company, Baltimore, Md**, v. 30, p. 292, 1944.

CURSONS, R. T.; BROWN, T. J. Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, p. 1-11, 1978.

CURSONS, R. T. *et al.* Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. **Infect Immun**, v. 29, p. 401-407, 1980.

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

DA ROCHA-AZEVEDO, B., TANOWITZ H. B., MARCIANO-CABRAL, F. Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae. **Interdiscip. Perspect Infect Dis**, p. 1–14, 2009.

DART, J. K; SAW, V. P; KILVINGTON, S. *Acanthamoeba* keratitis diagnosis and treatment update. **Am J Ophthalmol**, v. 148, n. 4, p. 487-499, 2009.

D'AURIA, A. *et al.* Cutaneous Acanthamoebiasis with CNS Involvement Post-Transplantation: Implication for Differential Diagnosis of Skin Lesions in Immunocompromised Patients. **Journal of Neuroparasitology**, v: 3, p. 1 a 7, 2012.

DE JONCKHEERE, J. F. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 39, p. 681–685, 1980.

DE JONCKHEERE, J. Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. **The Journal of protozoology**, v. 30, p. 701-706, 1983.

DE JONCKHEERE, J. F. Epidemiology in: Amphizoic Amoebae Human Pathology. **Rondanelli E.G**, p. 25-48, 1987.

DIAZ J. H. Increasing intracerebral infections caused by free-living amoebae in the United States and Worldwide. **J Neuroparasitol**, v. 1, p. 1–10, 2010.

DI CAVE, D. *et al.* *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 28, p. 607-612, 2009.

DOUGLAS, M. Notes on the classification of the amoeba found by Castellani in cultures of a yeast-like fungus. **J Trop Med Hyg**, v. 33, p. 258-259, 1930.

EDAGAWA, A. *et al.* Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. **Parasitol Res**, v. 105, n. 4, p. 1109-17, 2009.

FONT, R. L. *et al.* An animal model of *Acanthamoeba* keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** **20 (Suppl)**, 8, 1981.

FONT, R. L. *et al.* An animal model of *Acanthamoeba* keratitis: further studies with emphasis on the early phase destruction of the trophozoites. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, p. 163, 1982.

FUERST, P. A.; BOOTON, G.C.; CRARY. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. **The Journal of eukaryotic microbiology**. v. 62, p. 69-84, 2015.

GARATE, M. *et al.* "In vitro pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein". **Invest Ophthalmol VIS SCI**, v. 47, p. 1056-1062, 2006.

GAST, R. J. *et al.* Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 43, p. 498-504, 1996.

GAST, R. J. Development of an *Acanthamoeba* specific reverse dotblot and the discovery of a new ribotype. **J. Eukaryot. Microbiol.** v. 48, p. 609 – 615, 2001.

GONZÁLEZ-ROBLES, A. *et al.* Morphological Features and *In Vitro* Cytopathic Effect of *Acanthamoeba griffini* Trophozoites Isolated from a Clinical Case. **J Parasitol Res**, p. 1 - 10, 2014.

GOMES, M. A. *et al.* Virulence parameters in the characterization of strains of *Entamoeba histolytica*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 65-69, 1997.

GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 413-433, 2004.

GRIFIIN, J. L. Temperature tolerance of pathogenic and non-pathogenic free-living amoebas. **Science**, v. 178, p. 869-870, 1972.

HE, Y. G. *et al.* A pig model of *Acanthamoeba* keratitis: transmission via contaminated contact lenses. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 33, p. 126–133, 1992.

HEWETT, M. K. *et al.* Identification of a New *Acanthamoeba* 18S rRNA Gene Sequence Type, Corresponding to the Species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, (Lobosea: Acanthamoebidae). **Acta Protozool**, v 42, p. 325 - 329, 2003.

HOFFMANN, R.; MICHEL, R. Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 203, n. 3, p. 215–219, 2001.

HORN, M. *et al.* Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba spp.* related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. **Environmental microbiology**, v. 1, p. 357-367, 1999.

HURT, M. *et al.* Pathogenic *Acanthamoeba spp.* secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. **Infect Immun**, v. 71, p. 6243–6255, 2003.

IKEDA, Y *et al.* Assessment of real time polymerase chain reaction detection of *Acanthamoeba* and prognosis determinants of *Acanthamoeba* keratitis. **Ophthalmology**, 119, 1111–1119, 2012.

ILLINGWORTH, C. D. *et al.* *Acanthamoeba* keratitis: risk factors and outcome. **Br J Ophthalmol**, v. 9, p. 1078–1082, 1995.

JAISON, P. L.; CAO, Z. e PANJWANI, N. "Binding of *Acanthamoeba* to [corrected] mannose-glycoproteins of corneal epithelium: effect of injury". **Curr Eye Res**, v. 17, p. 770-776, 1998.

JONES, D. B.; LIESEGANG, T. J.; ROBINSON, N. M.. Cumitech 13, Laboratory diagnosis of ocular infections. Coordinating ed., J. A. Washington III. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C, 1981.

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

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

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

KHAN, N. A.; TAREEN, N. K. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. **Folia Parasitol**, v.50, p. 97-104, 2003.

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

KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. Predator vs aliens: bacteria interactions with *Acanthamoeba*. **Parasitology**, v. 141, p. 869-874, 2014.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: Biology and Pathogenesis. Karachi, Pakistan: **Caister Academic Press**, 2015.

KIM, E. C.; KIM, M.S. Bilateral *Acanthamoeba* Keratitis After Orthokeratology. **Cornea**, v. 23, p. 348-350, 2009.

KINNEAR, F. B. *Acanthamoeba* pathogenicity of corneal cells. **Journal of Infection**, v.49, n.4, p.310–316, 2004.

KOHSLER, M. *et al.* *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. **Parasitol Res**, v. 102, n. 5, p. 1069-72, 2008.

LANOCHA, N. *et al.* The occurrence *Acanthamoeba* (free living amoeba) in environmental and respiratory samples in Poland. **Acta Protozoologica**, v. 48, p. 271-279, 2009.

LARKIN, D. F. P.; EASTY, D. L. Experimental *Acanthamoeba* keratitis: I. Preliminary findings. **British Journal of Ophthalmology**, v. 74, p. 551-555, 1990.

LARKIN, D. F. P.; EASTY, D. L. Experimental *Acanthamoeba* keratitis: II Immunohistochemical evaluation. **British Journal of Ophthalmology**, v. 75, p. 421-424, 1991.

LORENZO-MORALES, J. *et al.* Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 99, p. 751–758, 2005.

LORENZO-MORALES, J. *et al.* Therapeutic potencial of a combination of two gene-specific small interfering RNAs against clinical strains of *Acanthamoeba*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 12, p. 5151-5155, 2010.

LORENZO-MORALES, J. *et al.* *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? **Trends in Parasitology**, v. 29, p. 181–187, 2013.

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

LYNCH, K. M. Ingestion of red blood corpuscles by an intestinal amoeba with eight-nucleated cyst. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 4, p. 43, 1924.

MACIVER, S. K.; ASIF, M.; SIMMEN, M. W.; LORENZO-MORALES, J. A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. **Eur. J. Protistol.** 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, p. 2845-2850, 2014.

MANNIS, M. J. *et al.* *Acanthamoeba* sclerokeratitis: determining diagnostic criteria. **Arch Ophthalmol**, v. 104, p.1313–1317, 1986.

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

MARTINEZ, A. J. Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p.399–402, 1991.

MARTÍNEZ-CASTILLO, M. Iron-binding protein degradation by cysteine proteases of *Naegleria fowleri*. **Biomed Res Int**, p. 416712–416718, 2015.

MARTINEZ, D. Y. *et al.* Successful treatment of *Balamuthia mandrillaris* amoebic infection with extensive neurological and cutaneous involvement. **Clin Infect Dis**, v. 51, p. 7–11, 2010.

MAZUR, T.; HADAS, E. The effect of the passages of *Acanthamoeba* strains through mice tissues on their virulence and its biochemical markers. **Parasitol Res**, v. 80, n. 5, p. 431-4, 1994.

MEENEY, A.; MUDHAR, H. S. "Histopathological reporting of corneal npathology by a biomedical scientist: the Sheffield Experience". **Eye (Lond)**, v. 27, p. 272-276, 2013.

MORA-GALINDO, J.; GUTIERREZ-LOZANO, M.; ANAYA-VELAZQUEZ, F. *Entamoeba histolytica*: kinetics of hemolytic activity, erythrophagocytosis and digestion of erythrocytes. **Arch Med Res**, v. 28, p 200-201, 1997.

MOON, E. K. *et al.* Down-regulation of cellulose synthase inhibits the formation of endocysts in *Acanthamoeba*. **Korean Journal of Parasitology**, V. 52(2), 131–135, 2014.

NACAPUNCHAI, D. *In vitro* cell-to-cell interaction of Thai *Acanthamoeba* isolated from the environment. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 1, p. 35, 2004.

NACAPUNCHAI, D. *et al.* Comparison of physiological, cytopathogenic and immunological properties between two environmental isolates of *Acanthamoeba spp.* **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v.36, p. 1–4, 2005.

NEFF, R. J. Mechanisms of purifying amoebae by migration on agar surfaces. **J Protozool**, v. 5, p. 226-231, 1958.

NIEDERKORN, J. Y. *et al.* The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 437-443, 1999.

NUPRASERT, W. *et al.* Identification of a Novel T17 Genotype of *Acanthamoeba* from Environmental Isolates and T10 Genotype Causing Keratitis in Thailand. **J Clinical Microbiol**, v. 48, p. 4636–4640, 2010.

OBEID, W. N. *et al.* Ceratite bilateral por *Acanthamoeba* – Relato de caso. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 66, p. 876-880, 2003.

O'HARA, C. M.; GARDNER, W. A. Jr.; BENNETT, B. D. "Immunoperoxidase staining of *Trichomonas vaginalis* in cytologic material," *Acta Cytologica*, vol. 24, no. 5, pp. 448–451, 1980.

OMAÑA-MOLINA, M. *et al.* Reevaluating the role of *Acanthamoeba* proteases in tissue invasion: Observation of cytopathogenic mechanisms on MDCK cell monolayers and hamster corneal cells. **BioMed Research International**, p. 1-13, 2013.

Organização Mundial de Saúde (OMS). *Amoebiasis*. Report of a WHO Expert Committee. W.H. O. **Tech. Rep. Ser**, v. 141, 1969.

PAGE, F. C. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. **The Journal of protozoology**, v. 14, n. 4, p. 709–24, 1967.

PAGE, F. C. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae with Instructions for Culture. **Freshwater Biological Association Scientific Publications**, Cumbria, England, v. 1, p. 122, 1988.

PANJWANI, N. "Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis". **Ocul Surf**, v. 8, p. 70-79, 2010.

POLAT, Z. A. *et al.* Clinical and histologic evaluations of experimental *Acanthamoeba* keratitis. **Parasitol Res**, v.101, p. 1621-1625, 2007.

POSSAMAI, O. C. *et al.* *Acanthamoeba* of three morphological groups and distinct genotypes exhibit variable and weakly inter-related physiological properties. **Parasitology Research**, v. 117, p. 1389–1400, 2018.

PUECH, V. *et al.* Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. **Microbiology**, v. 147, p. 1365–1382, 2001.

PUSSARD, M. Le genre *Acanthamoeba* Volkonsky 1931 (Hartmannellidae Amoebida). **Protistologica**, v. 2, p. 71–93, 1966.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**, v. 13, p. 557-610, 1977.

QVARNSTROM, Y.; NERAD, T. A.; VISVESVARA, G. S. Characterization of a New Pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., Isolated from a Human with Fatal Amoebic Encephalitis. **J Eukaryot Microbiol**, v. 60, p. 626-633, 2013.

RABINOVITCH, M. DE STEFANO, M. Phagocytosis of erythrocytes by *Acanthamoeba* sp. **Exp. Cell. Res**, v. 64, p. 275-258, 1971.

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

ROWBOTHAM, T. J. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. **J. Clin. Pathol.** 33: 1179 – 1183, 1980.

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

ROBERTS, C. W.; HENRIQUEZ, F. L. Drug target identification, validation, characterisation and exploitation for treatment of *Acanthamoeba* (species) infections. **Exp Parasitol**, v. 1, p. 91-6, 2010.

SAEED, A. *et al.* Risk factors, microbiological findings, and clinical outcomes in cases of microbial keratitis admitted to a tertiary referral center in Ireland. **Cornea**, v. 28, n. 3, p. 285-292, 2009.

SCHROEDER, J. M. *et al.* Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. **J Clin Microbiol**, v. 93, p. 1903-1911, 2001.

SEAL, D. V. *Acanthamoeba* keratitis up-date incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. **Eye**; v.17, p. 893–905, 2003.

SHIBAYAMA *et al.* Role of Erythrophagocytosis in Free-Living Amoebae. 2005. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/b2ac/4c052292b1872c0e76fa242b640ca66f14e5.pdf>. Acessado em 07/02/2018.

SHUSTER, F.L, VISVESVARA, G.S. Free-living amoebae as opportunistic and nonopportunistic pathogens of humans and animals. **Int J Parasitol**, v. 34, p; 1001–1027, 2004.

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

SOUZA-CARVALHO, F. R. *et al.* Serine-like proteolytic enzymes correlated with differential pathogenicity in patients with acute *Acanthamoeba* keratitis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 4, p. 603–609, 2011.

STOTHARD, D. R. *et al.* The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 45, p. 45-54, 1998.

STRATFORD, M. P; GRIFFITHS, A. J. Variations in the properties and morphology of cysts of *Acanthamoeba castellanii*. **Journal of General Microbiology**, v. 108, p. 33-37, 1978.

TALAMÁS-LARA, D. *et al.* Erythrophagocytosis in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* a comparative study. **BioMed. Res. Int.**, p. 1-10, 2014.

THOMAS, P. A. Kuriakose T. Rapid detection of *Acanthamoeba* cysts in corneal scrapings by lactophenol cotton blue staining. **Arch Ophthalmol**, v. 108, p. 168, 1990.

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

TRISSEL, D. *et al.* Surface properties of *Entamoeba histolytica*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. **J. exp. Med.**, v. 148, p. 1137-1145, 1978.

TURNER, M. L. *et al.* "Antigens of selected *Acanthamoeba* species detected with monoclonal antibodies," **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 9, p. 981–990, 2005.

TYZZER, E. E.; QUENTIN, M. G. The ingestion of red blood cells by *Entamoeba coli* and its significance in diagnosis. **Am. J. Hyg**, v. 28, p. 271, 1938.

VAN KLINK, F. *et al.* The role of contact lenses, trauma and Langerhans cells in a Chinese hamster model of *Acanthamoeba* keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 34, p. 1937-1944, 1993.

VASSENEIX, C. *et al.* A keratitis rat model for evaluation of anti-*Acanthamoeba* polyphaga agents. **Cornea**, v. 25, p. 597–602, 2006.

VISVESVARA, G. S. Classification of *Acanthamoeba*. **Rev Infect Dis**, v. 13, p. S369-72, 1991.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1–26, 2007.

VISVESVARA, G. S.; SCHUSTER, F.L. Opportunistic Free-living Amebae, Part I. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 30, n. 20, p. 151-158, 2008.

VISVESVARA, G. S. Free-living amebae as opportunistic agents of human disease. **J Neuroparasitol**, v. 1, p. 1-10, 2010.

VOLKONSKY, M. *Hartmannella castellanii* Douglas et classification des Hartmannelles. **Archs Zool. Exp. Gen.**, v. 72, p. 317, 1931.

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

WALOCHNIK, J. *et al.* Discrimination between clinically relevant and nonrelevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens-wearing keratitis patients in Austria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3932-3936, 2000.

WALOCHNIK, J., SOMMER, K., OBWALLER, A. E., SCHOBER M. H., ASPOCK, H. Characterisation and differentiation of pathogenic and non pathogenic *Acanthamoeba* strains by their protein and antigen profiles. **Parasitology Research**. 92: 289 – 298, 2004.

WILCOEKS, C.; MANSON-BAHR, P. E. C. Manson's Tropical Diseases. **Balliere, Tindall, & Cassell, Ltd.** London, ed. 17, p. 975, 1972.

WILHELMUS, K. R. *et al.* Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using calcofluor white. **Arch Ophthalmol**, v. 104, p. 1309-1312, 1986.

WILHELMUS, K. R. *et al.* Bilateral *Acanthamoeba* Keratitis. **Am J Ophthalmol.**, v. 145, p. 193–197, 2008.

WITTNER, M; ROSENBAUM, R. M. Role of bacteria in modifying virulence of *Entamoeba histolytica*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 19, p. 755-761, 1970.

WONG, M.M; KARR, S.L. JR; BALAMUTH, W. B. Experimental infections with pathogenic free-living amebae in laboratory primate hosts: I. A study on susceptibility to *Acanthamoeba culbertsoni*. **J Parasitol.**, v. 61, p. 682-90, 1975.

ZAMAN, V. Ingestion of erythrocytes by *Entamoeba*. **Acta Trop**, v. 27. p. 178, 1970.

ANEXO I – MEIOS DE CULTIVO E SOLUÇÕES PARA CULTURA DE ACANTHAMOEBA

I - Ágar não-nutriente (NNA)

100 mL de solução salina de Page (1X)

1,5 g de Ágar

Preparo: O ágar foi dissolvido em 100 mL da solução salina, aquecida até a completa dissolução e esterilizado por autoclavagem (121°C por 15 min). A distribuição do ANN foi realizada em placas bacteriológicas estéreis.

II - Solução Salina de Page

120 mg de Cloreto de sódio (NaCl)

4 mg de Sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O)

142 mg de Hidrogenofosfatodissódico anidro (Na₂HPO₄)

136 mg Diidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄)

4 mg de Cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O)

Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do CaCl₂ que foi dissolvido separadamente e adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em 6,5 ± 0,2 e a solução esterilizada por autoclavagem (121°C por 15 min).

III - Meio Proteose Peptona Extrato de Levedo e Glicose (PYG) pH 6,5 ± 0,2

7,5 g de Proteose peptona

0,75 g de Extrato de levedo

0,98 g de Sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O)

0,059 g de Cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O)

1 g de Citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O)

0,02 g de Sulfato ferroso amoniacal [Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6 H₂O]

0,034 g de Diidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄)

0,355 g de Hidrogenofosfatodissódico anidro

15 g de Glicose (C₆H₁₂O₆)

Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do CaCl_2 que foi dissolvido separadamente e adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em $6,5 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem (121°C por 20 min).

IV - Solução Salina Estéril de Neff (encistamento)

2,423 g de Tris-HCl (20 mM), Tris hidroximetilaminometano ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$)

7,456 g de KCl (100mM), Cloreto de potássio

1,972 g (8 mM), Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)

0,045 g (0,04 mM), Cloreto de cálcio (CaCl_2)

0,084 g (1 mM), Bicarbonato de sódio (NaHCO_3)

Água destilada q.s.p 1000 mL

- Acertar o pH para 9.0
- Completar o volume com água destilada a quantidade a ser preparada
- Filtrar em papel de filtro
- Proceder à esterilização por autoclavação

ANEXO II – PRANCHAS COM IMAGENS MICROSCÓPICAS DE LESÕES EM CÓRNEA DE RATOS WISTAR INDUZIDA POR ACANTHAMOEBA

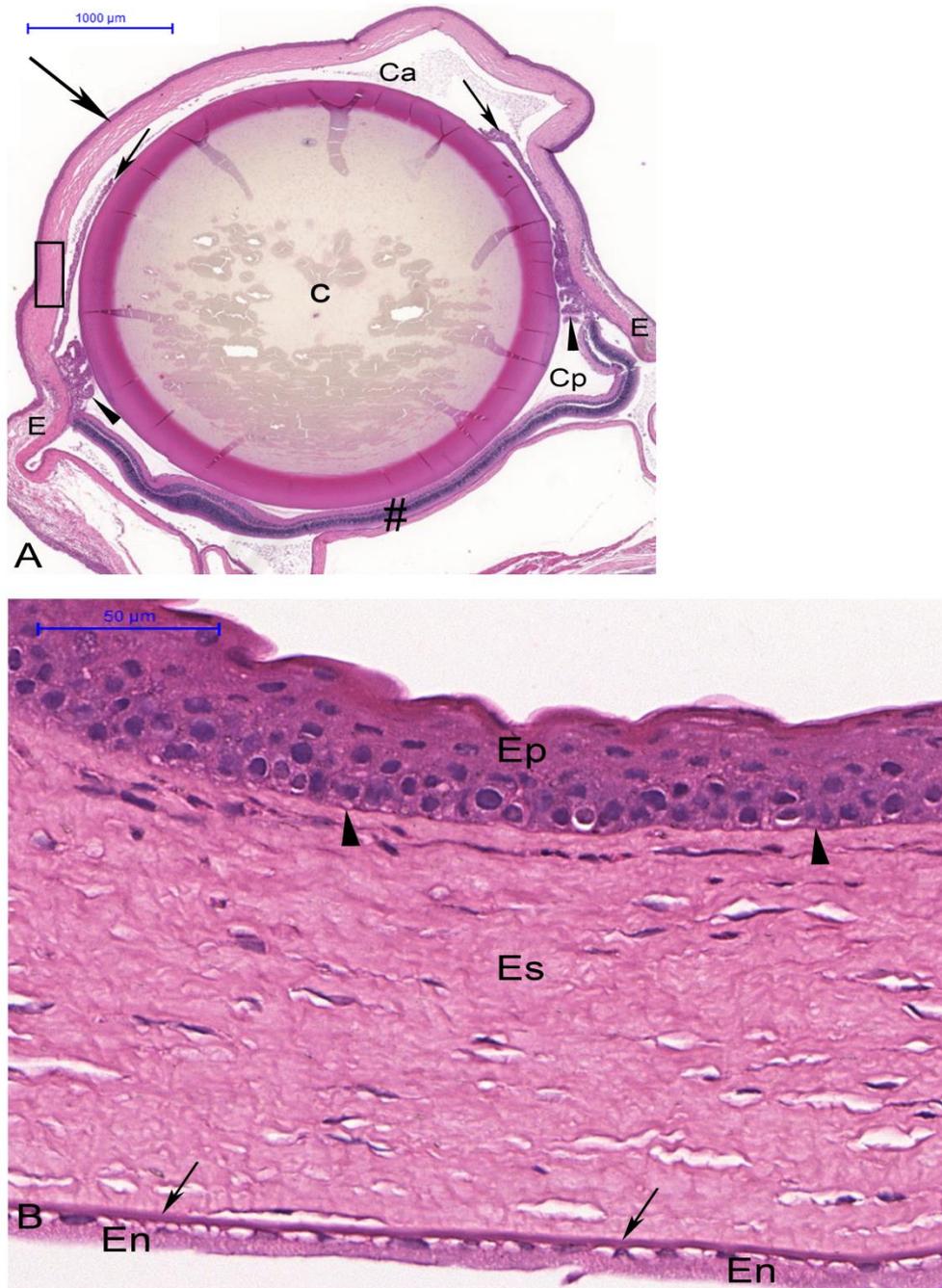


Figura 8 - Olho esquerdo de rato submetido à eutanasia 7 dias após a aplicação por via intraestromal de tampão fosfato (PBS): A) Visão panorâmica mostrando algumas estruturas e regiões de aspecto aparentemente normal. Córnea (Setas grandes); câmara anterior (Ca); íris (Setas pequenas); cristalino (C); corpo ciliar (Cabeças de setas); esclerótica (E); câmara posterior (Cp) e retina (#). Barra = 1000µm. B) Maior aumento da figura anterior (representa o retângulo preto da figura A) mostrando detalhes da córnea normal. Camada de tecido epitelial pavimentoso estratificado (Ep); camada de Bowman (Cabeças de seta); estroma (Es); membrana de Descemet (Setas) e endotélio (En). HE. Barra = 50µm.

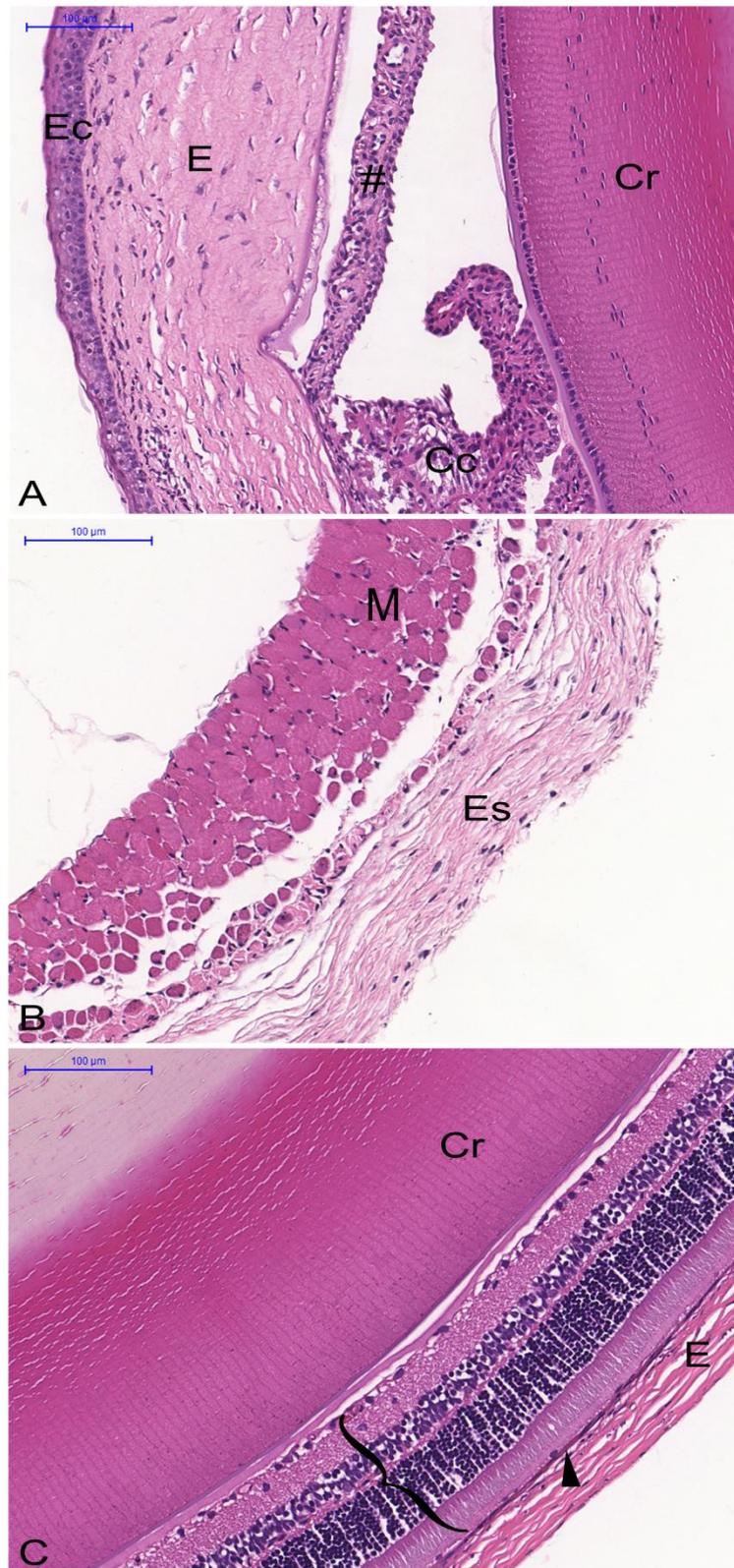


Figura 9 - Olho esquerdo de rato submetido à eutanásia 7 dias após a aplicação por via intraestromal de tampão fosfato (PBS): Detalhes da figura 9: A) Epitélio corneal (Ec); estroma corneal (E); íris (#), corpo ciliar (Cc) e cristalino (Cr). B) Músculo ciliar (M) e esclerótica (E); C) Cristalino (Cr); retina (Chave), coróide (Cabeça de seta) e esclerótica (E). HE. Barra = 100µm.

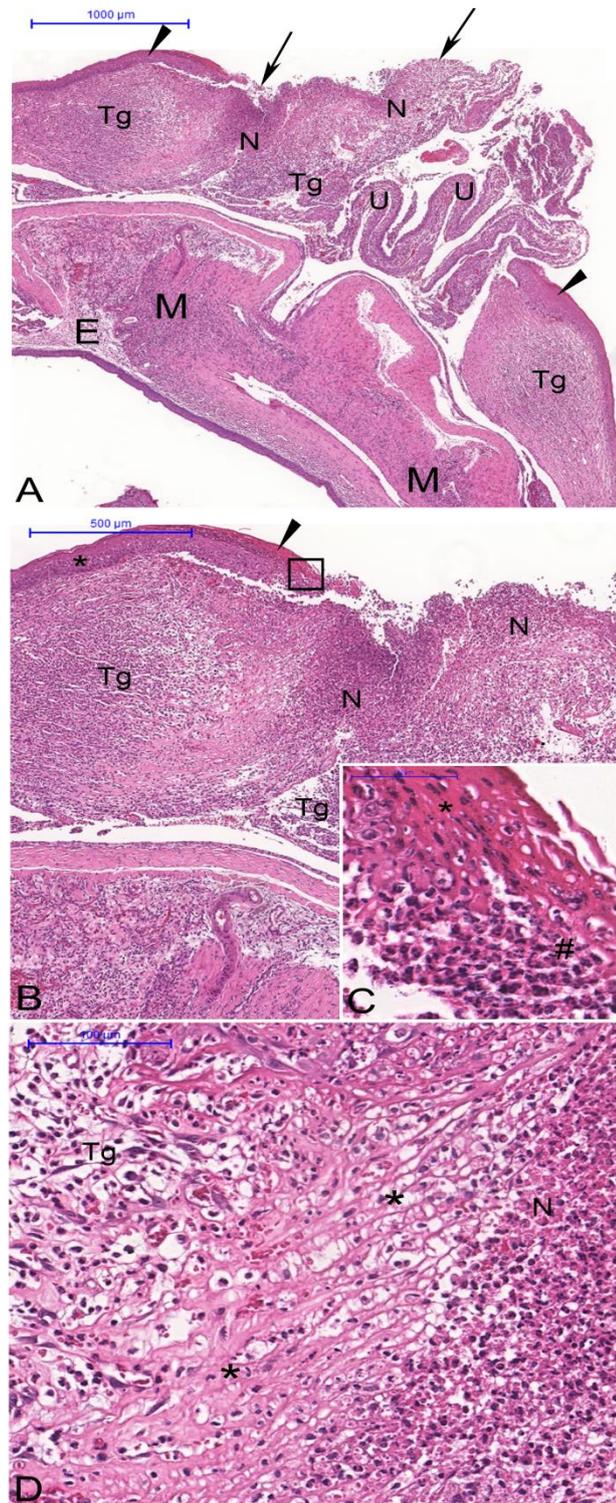


Figura 10 - Olho direito de rato submetido à eutanásia 7 dias após a inoculação intraestromal de trofozoítos $2,5 \times 10^4$ de *Acanthamoeba* da cepa SoA1: A) Visão panorâmica mostrando ampla úlcera corneana (Setas). Desaparecimento do epitélio corneal (setas) e áreas de necrose (N). Grandes áreas do estroma corneal ocupadas por tecido de granulação (Tg). Outras estruturas apresentam-se inflamadas: íris e corpo ciliar (U), músculo ciliar (M) e esclerótica (E). As bordas da úlcera são delimitadas pelo epitélio corneal não-necrosado (Cabeças de seta). Barra = 1000 μ m; B) Maior aumento da figura anterior mostrando necrose (N), tecido de granulação (Tg), epitélio corneal necrosado (Cabeça de seta) e não-necrosado (*). Barra = 500 μ m; C) Detalhe da figura anterior (representa o retângulo preto da figura B). Necrose do epitélio corneal (*). Debris celulares e granulócitos (#). Barra = 50 μ m; D) Maior aumento da figura B mostrando necrose hemorrágica (N), tecido de granulação (Tg) e deposição de fibrina (*). HE. Barra = 100

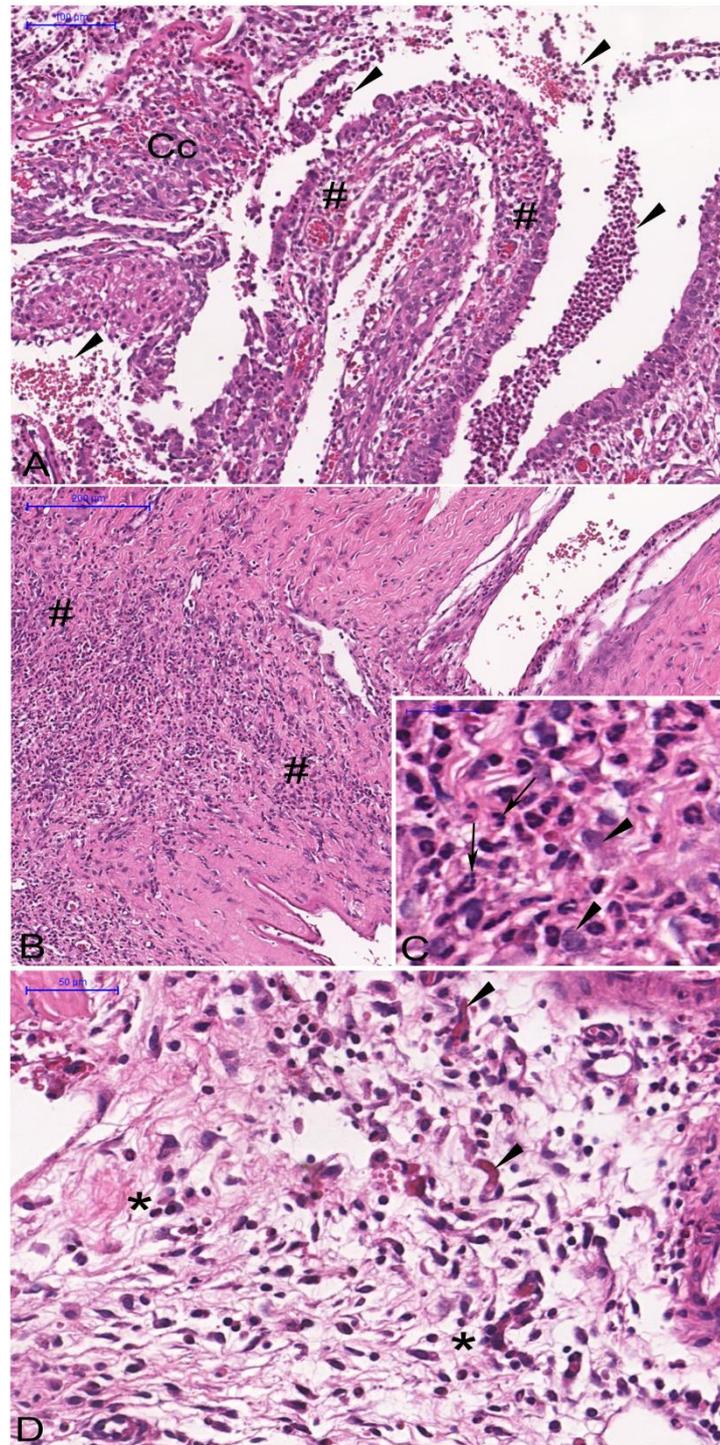


Figura 11 - Olho direito de rato submetido à eutanasia 7 dias após a inoculação intraestromal de trofozoítos $2,5 \times 10^4$ de *Acanthamoeba* da cepa SoA1: Detalhes da figura 11: A) Uveíte anterior caracterizada por infiltrado inflamatório e hiperemia em corpo ciliar (Cc) e edema; hiperemia e infiltrado inflamatório na íris (#). Notar a presença de células inflamatórias, hemorragia e células descamadas na câmara anterior (Cabeças de setas). Barra = 100µm; B) Infiltrado inflamatório em músculo ciliar (#). Barra = 200µm; C) Detalhe da figura anterior mostrando que o infiltrado inflamatório é constituído principalmente por neutrófilos (Setas) e macrófagos (Cabeças de seta). Barra = 20µm; D) Inflamação da esclerótica. Infiltrado inflamatório, edema (*) e vaso neoformados (Cabeças de seta). HE. Barra = 50µm.

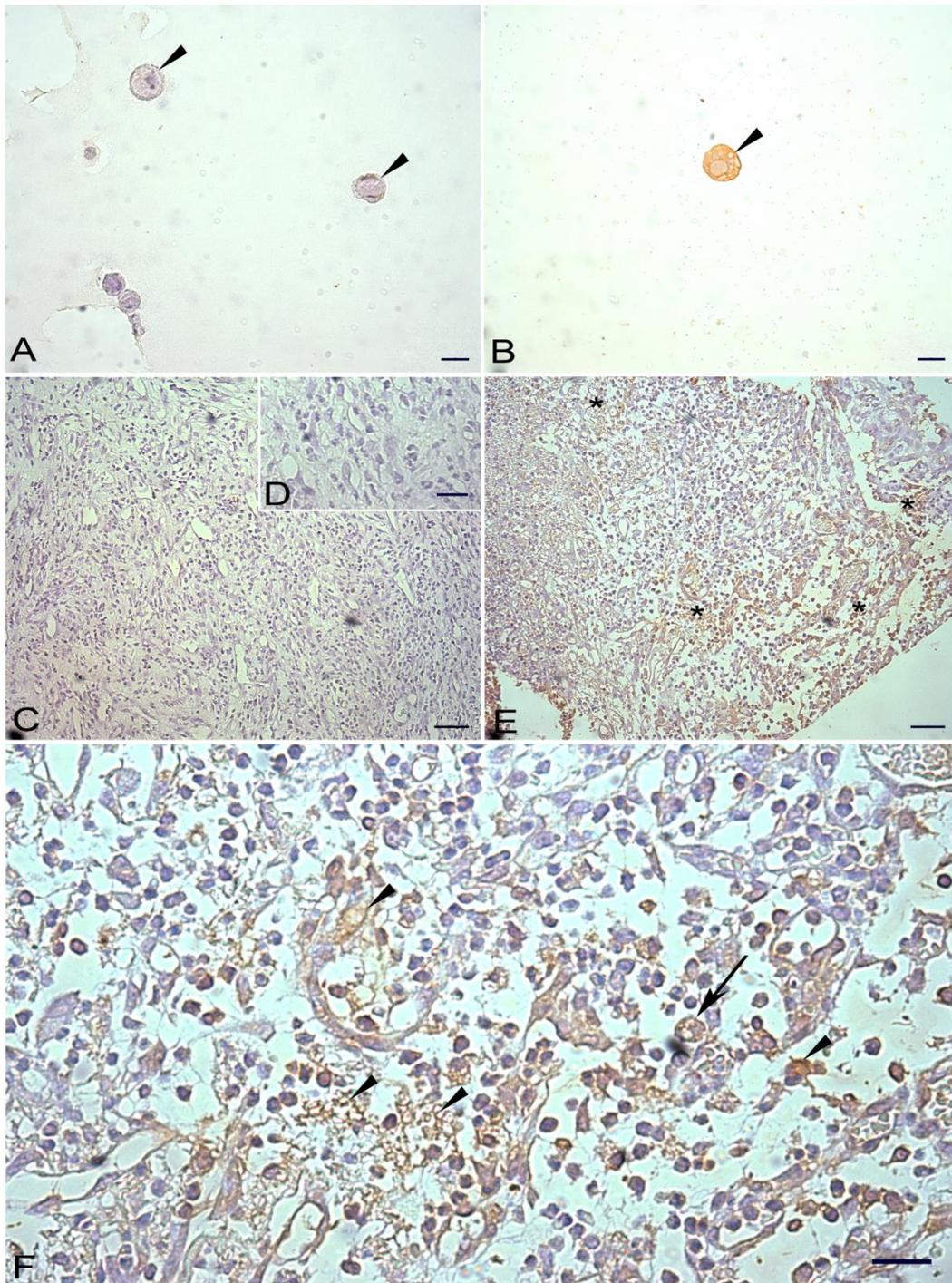


Figura 12 - Reação imunocitoquímica e imuno-histoquímica anti-*Acanthamoeba*. A) Controle negativo de reação imunocitoquímica anti-*Acanthamoeba*. Ausência de coloração marrom em trofozoítos (Cabeças de seta) de esfregaço obtidos de cultivo "in vitro". Barra = 20 µm; B) Controle positivo de reação imunocitoquímica anti-*Acanthamoeba*. Coloração marrom em trofozoíto (Cabeça de seta) indicando reação positiva. Barra = 20 µm; C) Controle negativo de reação imuno-histoquímica anti-*Acanthamoeba* em olho direito de rato inoculado com *Acanthamoeba*. Notar a ausência de coloração marrom. Barra = 20 µm; D) Maior aumento da figura anterior. Barra = 50 µm; E) Reação imuno-histoquímica positiva anti-*Acanthamoeba* em olho direito de rato inoculado com *Acanthamoeba*. Coloração marrom em muitas áreas do estroma corneal (Asteriscos). Barra = 20 µm; F) Maior aumento da figura anterior. Notar a presença de coloração marrom em trofozoíto (Seta), no meio extracelular e no interior de células do infiltrado inflamatório (Cabeças de setas), indicando a presença de antígenos de *Acanthamoeba*. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Barra = 50 µm.

ANEXO III – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de patogenicidade de Acanthamoeba em modelo experimental de ceratite amebiana", protocolo do CEUA: 265/2018 sob a responsabilidade de Adriana Oliveira Costa que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 17/09/2018.

Vigência da Autorização	17/09/2018 a 16/09/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	2
Peso/Idade	320g / 90(dias)
Sexo	masculino
Origem	Bitério Faculdade de Farmácia -UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	9
Peso/Idade	180g / 45(dias)
Sexo	masculino
Origem	Bitério Faculdade de Farmácia -UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	9
Peso/Idade	180g / 45(dias)
Sexo	masculino
Origem	Bitério Faculdade de Farmácia -UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	9
Peso/Idade	180g / 45(dias)
Sexo	masculino
Origem	Bitério Faculdade de Farmácia -UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	9
Peso/Idade	180g / 45(dias)

Sexo	masculino
Origem	Biotério Faculdade de Farmácia -UFMG

Considerações posteriores:

17/09/2018	Aprovado na reunião do dia 03/09/2018. Validade: 17/09/2018 à 16/09/2023
------------	---

Belo Horizonte, 29/04/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br