

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

ISABELA AURORA RODRIGUES

**Avaliação funcional de vesículas extracelulares de
Acanthamoebade diferentes genótipos**

Belo Horizonte

2021

ISABELA AURORA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE VESÍCULAS EXTRACELULARES
DE ACANTHAMOEBAE DE DIFERENTES GENÓTIPOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de doutor (a) em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Dra. Adriana Oliveira Costa

Co-orientador: Dr. Rodrigo Pedro P. Soares

Belo Horizonte

2021

R696a Rodrigues, Isabela Aurora.
Avaliação funcional de vesículas extracelulares de *acanthamoeba*
de diferentes genótipos / Isabela Aurora Rodrigues. – 2021.
104 f. : il.

Orientadora: Adriana Oliveira Costa.
Coorientador: Rodrigo Pedro Pinto Soares.

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

1. Genótipo – Teses. 2. Protozoários – Teses. 3. Relação
hospedeiro-parasito – Teses. 4. Camundongo – Teses. 5. Imunidade –
Teses. I. Costa, Adriana Oliveira. II. Soares, Rodrigo Pedro Pinto. III.
Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV.
Título.

CDD: 616.01

Elaborado por Leandro da Conceição Borges – CRB-6/3448



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação funcional de vesículas extracelulares de *Acanthamoeba* de diferentes genótipos

ISABELA AURORA RODRIGUES

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinte e oito de maio de dois mil e vinte e um**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Prof. **Rodrigo Pedro Pinto Soares** - Coorientador
Fiocruz-Minas

Profa. **Claudia Masini d Avila**
IOC/Fiocruz

Profa. **Patrícia Xander Batista**
UNIFESP-Diadema

Profa. **Cristiane Alves da Silva Menezes**
UFMG

Profa. **Helida Monteiro de Andrade**
UFMG

Profa. **Adriana Oliveira Costa** - Orientadora
UFMG

Belo Horizonte, 31 de maio de 2021.

Documento assinado eletronicamente por **Adriana Oliveira Costa, Professora do Magistério**



Superior, em 31/05/2021, às 17:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Alves da Silva Menezes, Coordenador(a)**, em 01/06/2021, às 15:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helida Monteiro de Andrade, Coordenador(a)**, em 01/06/2021, às 15:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Xander Batista, Usuário Externo**, em 02/06/2021, às 15:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Masini Davila, Usuário Externo**, em 07/06/2021, às 05:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Pedro Pinto Soares, Usuário Externo**, em 08/06/2021, às 13:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0758230** e o código CRC **6BE1680F**.

Agradecimentos

Ao meu Deus pelo olhar atento, proteção e pelas inúmeras bênçãos que me proporcionou.

Meus sinceros agradecimentos aos meus pais Edson e Mary pelo incentivo e exemplo de vida inspirador.

Agradeço à minha família e aos amigos pelo apoio constante e incondicional mesmo não entendendo a rotina e dificuldade de uma vida científica.

Ao meu filho, que ainda no meu ventre, compartilha comigo todos os meus sentimentos e me fortalece.

À minha orientadora Dra. Adriana Costa por acreditar em mim desde o princípio e me confiar este trabalho e as demais tarefas, pela amizade, generosidade e pelo apoio indispensável dentro e fora do laboratório. Com certeza, é a pessoa mais humana que conheço e o meu maior exemplo profissional.

Ao meu coorientador Dr. Rodrigo Soares pela experiência passada, pelo tratamento cordial, ensinamentos e paciência.

À Profa Dra Ana Cláudia Trocolli Torrecilhas, pela valiosa colaboração na realização do projeto.

Aos colaboradores Armando, Paula e Felipe pelo suporte e auxílios nos experimentos.

Às amigas cultivadas na UFMG e Centro de Pesquisas René Rachou.

A todo o corpo docente e discente do programa de pós de Análises Clínicas e Toxicológicas- ACT e do Centro de Pesquisas René Rachou pela estrutura e apoio oferecido.

Aos técnicos: Beto, Vanda, Leninha, Mariza e as meninas da limpeza pelo carinho comigo e manutenção mantendo o ambiente agradável.

Aos Laboratórios parceiros: Imunologia Celular, Toxicologia e Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia e aos laboratórios do Grupo Funcional de Parasitologia (GFP) e PROREC da FIOCRUZ pela estrutura e suporte.

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

A todos que de certa forma contribuíram para este trabalho, de forma direta ou indireta.

E por último, e não menos importante, as minhas “meninas” que pertencem ao melhor gênero de amebas, que me proporcionaram orgulho com os dados gerados.

Resumo

As amebas do gênero *Acanthamoeba* são protozoários de vida livre amplamente dispersos no ambiente. Em algumas situações, elas são capazes de se adaptar a um tipo de vida parasitária, se transformando em patógenos que causam graves infecções em humanos. A capacidade de *Acanthamoeba* causar infecções por *Acanthamoeba* envolve fatores como a produção de proteases, que podem ser liberadas livremente no meio ambiente ou, conforme demonstrado em estudos recentes, compartimentadas em vesículas extracelulares (VEs). No entanto, a caracterização comparativa das VEs de diferentes cepas ainda não foi descrita. O objetivo deste estudo foi realizar a comparação entre VEs produzidas por *Acanthamoeba* de diferentes genótipos, avaliando as características físicas, perfil de proteases e de produção de óxido nítrico e citocinas após estimulação de macrófagos murinos. Foram utilizadas quatro cepas com diferentes características de patogenicidade, sendo três de origem ambiental (amostras de genótipos T1, T2, T11) e uma de caso de ceratite amebiana (amostra de genótipo T4). As VEs foram obtidas por ultracentrifugação, quantificadas por análise de rastreamento de nanopartículas e analisadas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão. O perfil de proteases das VEs foi determinado por zimografia. A produção de óxido nítrico e citocinas por macrófagos peritoneais de murinos foi medida após estimulação com VEs, usando camundongos de linhagens selvagens (BALB/c e C57BL/6) e nocautes para TLR2 e TLR4 (C57BL/6 TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}). Todas as cepas, independentemente do genótipo, liberaram VEs e não houve diferença no tamanho ou concentração entre elas. As VEs exibiram atividade predominante de serinoproteases (pH 7,4 e 3,5), com atividade mais intensa nas cepas T4 e T1. As VEs da cepa ambiental não patogênica T11 exibiram um perfil mais pró-inflamatório, induzindo níveis mais elevados de óxido nítrico, fator de necrose tumoral alfa e interleucina-6, via TLR4 / TLR2, do que aquelas cepas com características patogênicas (T4, T1) e moderadamente patogênica (T2). A produção de óxido nítrico por macrófagos foi significativamente menor quando esses foram interagidos com VEs pré-incubadas com inibidores de proteases ou inativadas por aquecimento. Em conjunto, esses dados indicam que VEs de *Acanthamoeba* exibem efeitos imunomoduladores que estão relacionados a seu potencial patogênico e que são dependentes da integridade das proteases.

Palavras-chave: genótipos; interação parasita-hospedeiro; imunidade inata; proteases.

Abstract

Amoebas of the genus *Acanthamoeba* are free-living protozoa widely dispersed in the environment. In some situations, they can adopt a parasitic lifestyle and acts as pathogens that cause serious infections in humans. The ability of *Acanthamoeba* to cause infections involves factors as the production of proteases, which can be released freely in the environment or, as shown in recent studies, compartmentalized in extracellular vesicles (EVs). However, the comparative characterization of EVs of different strains has not yet been described. This study aimed to compare EVs produced by *Acanthamoeba* from different genotypes, evaluating physical features, profile of proteases and of nitric oxide and cytokines production after stimulation of murine macrophages. Four strains with different pathogenic characteristics were used: three from an environmental origin (samples of genotypes T1, T2, T11) and one obtained from a keratitis case (sample of genotype T4). Despite their genotype, all strains released EVs with no differences in size or concentration. EVs exhibited a predominant activity of serine proteases (pH 7.4 and 3.5), with more intense activity in those from T4 and T1 strains. Despite their genotype, all strains released EVs with no differences in size or concentration. EVs exhibited a predominant activity of serine proteases (pH 7.4 and 3.5), with more intense activity in those from T4 and T1 strains. Compared with pathogenic (T4 and T1) and moderately pathogenic (T2) strains, EVs from the environmental, nonpathogenic T11 strain exhibited a more proinflammatory profile, inducing higher levels of NO, tumor necrosis, and interleukin-6 via TLR4/TLR2. Pre-incubation with EVs treated with protease inhibitors or heating drastically decreased nitrite concentration production in macrophages. Altogether, these data indicated that EVs from *Acanthamoeba* exhibit immunomodulatory effects related to their pathogenic potential and dependent on the integrity of the proteases.

Keywords: genotypes; host-parasite interaction; innate immunity; proteases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Atual classificação filogenética de <i>Acanthamoeba</i>	3
Figura 2: Esquema comparativo dos grupos morfológicos de <i>Acanthamoeba</i>	4
Figura 3: Formas evolutivas de <i>Acanthamoeba</i> spp	6
Figura 4: Encefalite amebiana granulomatosa	10
Figura 5: Lesões características de Ceratite Amebiana	12
Figura 6: O processo de invasão da córnea por <i>Acanthamoeba</i>	13
Figura 7: Liberação de microvesículas e exossomos.	20
Figura 8: Esquema de transferência de estruturas por VEs	21
Figura 9: Esquema das amostras e dos animais utilizados nos ensaios imunológicos	37
Figura 10: Análise de rastreamento de partículas (NTA) de vesículas extracelulares (VEs) de <i>Acanthamoeba</i>	39
Figura 11: Microscopia eletrônica de varredura de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> em processo de vesiculação.:	41
Figura 12: Microscopias eletrônicas de transmissão de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> em vesiculação.	42
Figura 13: Zimografia das VEs de cepas de <i>Acanthamoeba</i>	44
Figura 14: Produção de óxido nítrico (NO), TNF- α e IL-6 por macrófagos peritoneais primados com INF γ e estimulados com VEs de <i>Acanthamoeba</i> .	45
Figura 15: Viabilidade celular dos macrófagos das linhagens BalbC e C57Bl/6 durante estimulação com VEs.	46
Figura 16: Produção de NO por <i>Acanthamoeba</i> VEs aquecidas e pré-incubadas com diferentes inibidores de proteases	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Função das vesículas extracelulares em diferentes parasitos humanos..... 23

Tabela 2: Características principais das amostras de *Acanthamoeba* utilizadas no presente estudo:..... 27

Lista de símbolos e abreviações

α -alfa

< - menor

° C - Grau Celsius

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ATCC - *America Type Culture Collection*

AVL - Amebas de Vida Livre

CA - Ceratite Amebiana

CBA - Cytometric Bead Array

cm² - centímetro quadrado

CN - Controle Negativo

EAG - Encefalite Amebiana Granulomatosa

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

E64(1 - [L - N - (trans - epoxysuccinyl) - leucyl] amino - 4 - guanidinobutane)

h - hora

HIV - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

IL-6 interleucina 6

IL-12 interleucina 12

INF γ Interferón gama

kDa:- kilodaltons

M: molar

MAPK – MAP quinase

mg miligrama

MIP-133 Proteína induzida por manose de aproximadamente 133 kDa

MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}.

mL mililitro

mM milimolar

NaOH Hidróxido de Sódio

nm - nanômetro

NTA - Nanoparticle Tracking Analysis

NO Óxido nítrico

pH - Potencial Hidrogeniônico

pg - picograma

PMSF - Fluoreto de Fenilmetilsulfonila

PYG - Meio Proteose Peptone-Extrato de Levedo-Glicose

RIPA 1x PBS, 1% Nonidet P-40, 0.5% desoxicolato de sódio, 0.1% SDS

RNA - ácido ribonucleico

RPM - rotação por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)

SDS- PAGE - Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida

SFB - Soro Fetal Bovino

TNF- α – Fator de necrose tumoral

TRIS -Tris-hidroximetilaminometano

TRITON X-100 - Polietilenoglicol-terc-octilfenil éter

U -unidade de atividade enzimática

VEs - vesículas extracelulares

μ L -microlitro

μ m - micrômetro

μ M- micromol

xg - gravidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Classificação taxonômica, morfológica e molecular do gênero <i>Acanthamoeba</i>	16
2.2. Morfologia e biologia de <i>Acanthamoeba</i>	18
2.3 Infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i>	21
2.3.1 Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG)	21
2.3.2 Ceratite Amebiana	23
2.3.3.Tratamento das infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i>	27
2.4 Patogenicidade de <i>Acanthamoeba</i>	28
2.4.1 Mecanismos indiretos.....	29
2.4.3 Mecanismos diretos	30
2.5Atividade imunológica em infecções por <i>Acanthamoeba</i>	31
2.6Vesículas extracelulares	33
2.6.1 Interação e função das VEs	34
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo Geral:	39
3.2 Objetivos Específicos:.....	39
3.2.1.....	39
3.2.4.....	39
3.2.5.....	39
4. METODOLOGIA.....	40
4.1 Cultivo dos Isolados de <i>Acanthamoeba</i>	40
4.2 Condições de vesiculação.....	42
4.3 Isolamento das vesículas extracelulares	42
4.4 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	43
4.5 Microscopia eletrônica.....	43
4.6 Atividade de proteases nas VEs de <i>Acanthamoeba</i>	45
4.7Indução de marcadores inflamatórios por VEsde <i>Acanthamoeba</i>	46
4.7.1 Animais.....	46
4.7.2 Preparo dos macrófagos	46
4.7.3 Estimulação dos macrófagos.....	46
4.7.4 Dosagem de óxido nítrico.....	47
4.7.5Dosagem de IL-6 e TNF- α	48
4.7.6 Viabilidade dos macrófagos estimulados por VEs e lisado celular	48

4.7.7Papel das proteases carregadas por VEs na produção de NO	49
4.8 Análise estatística.....	49
5. RESULTADOS	52
5.1 <i>Acanthamoeba</i> produz VEs com características comuns entre os diferentes genótipos..	52
5.2 As VEs carregam proteases predominantemente classificadas como serinoproteases	57
5.3 As VEs das cepas patogênicas e não patogênicas apresentaram diferentes níveis de ativação pró-inflamatória em macrófagos murinos	58
5.4. A produção de Óxido Nítrico pelas VEs das cepas consideradas patogênicas depende da integridade das proteases.....	60
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÃO	71
8. REFERÊNCIAS.....	72
9. ANEXOS	87

1. INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários distribuídos amplamente na natureza, podendo ser encontradas tanto em ambientes naturais como o solo, vegetação, água (lagos, rios, etc), quanto em artificiais, como sistemas de ar condicionado, piscinas, acessórios e equipamentos hospitalares (CLARKE; NIEDERKORN, 2006). Elas constituem um grupo amplo e diversificado composto por vários gêneros e centenas de espécies (PAGE, 1988). São consideradas predadoras de bactérias e atuam controlando a sua população no solo e em ambientes aquáticos. Outra característica dessas amebas é a capacidade de resistir ao processo de cloração da água, o que possibilita a proteção de alguns microrganismos fagocitados, como fungos e bactérias, servindo como um reservatório para infecções em humanos. (CHAVATTE *et al.*, 2016; MARCIANO-CABRAL *et al.*, 2003). Diferentemente da espécie *Entamoeba histolytica*, que é fundamentalmente um organismo parasita do ser humano, as amebas de vida livre não necessitam de hospedeiro para sobreviver. No entanto, são seres anfizóicos, podendo eventualmente serem capazes de se adaptar a um tipo de vida parasitária e causar infecções em humanos e outros vertebrados (KHAN *et al.*, 2006; MARTINEZ; VISVESVARA, 1997). Nesse grupo, também denominado AVL com potencial patogênico, incluem-se *Naegleria fowleri*, *Sappinia pedata*, *Balamuthia mandrillaris* e as espécies do gênero *Acanthamoeba*.

O gênero *Acanthamoeba* representa as AVL potencialmente patogênicas mais frequentemente isoladas do ambiente (LORENZO-MORALES *et al.*, 2005), estando associado a duas graves infecções principais: a Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) e a Ceratite Amebiana (CA). A EAG ocorre predominantemente em indivíduos imunocomprometidos e é uma infecção considerada rara, mas com alta taxa de letalidade (THAMTAM *et al.*, 2016). A CA tem aumentado em número nos últimos anos, especialmente devido ao uso de lentes de contato, associada ao manuseio inadequado ou falta de higiene com esses acessórios (LORENZO-MORALES *et al.*, 2015).

Diversos fatores têm sido investigados para compreender a capacidade de *Acanthamoeba* agir como patógeno. O gênero é composto por várias

espécies (PUSSARD & PONS, 1977), porém atualmente a classificação de isolados é realizada com base em genótipos determinados por sequenciamento do 18SrDNA. As infecções ocorrem mais frequentemente por *Acanthamoeba* de genótipo T4, embora outros também estejam envolvidos com menos frequência (MACIVER *et al.*, 2013). Linhagens de *Acanthamoeba* com maior potencial patogênico apresentam algumas características fisiológicas que as tornam capazes de estabelecer o processo infeccioso. Fatores como a expressão de moléculas de adesão, produção de proteases que agem sobre os tecidos, capacidade de se transformar em formas cística durante a infecção, são alguns exemplos do que vem sendo estudado para compreender a fisiopatologia das infecções (CLARKE; ALIZADEH; NIEDERKORN, 2006; RETANA-MOREIRA *et al.*, 2015). Considerando que algumas infecções por *Acanthamoeba* são oportunistas, fatores do hospedeiro também devem ser considerados, e por isso elementos da resposta imune também são investigados (MACIVER *et al.*, 2013; REN & WU, 2011).

Recentemente, foi demonstrado que *Acanthamoeba* produz e libera vesículas extracelulares (VEs), que parecem estar envolvidas em mecanismos de patogenicidade dessas amebas (GONÇALVES *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2019). As VEs são estruturas ou partículas com membranas, já identificadas como componentes produzidos por diversos tipos celulares, e que desempenham papéis em processos patológicos e fisiológicos (CAMPOS *et al.*, 2015). Os estudos realizados com VEs de *Acanthamoeba* são recentes e utilizaram apenas uma linhagem (GONÇALVES *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2019). Não há informações sobre a variação de perfil de produção VEs ou diferenças em aspectos funcionais entre diferentes linhagens ou genótipos de *Acanthamoeba*. Considerando esta lacuna, a hipótese de que VEs de *Acanthamoeba* de diferentes genótipos apresentam características funcionais distintas é investigada nesse trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Classificação taxonômica, morfológica e molecular do gênero

Acanthamoeba

As amebas do gênero *Acanthamoeba* foram inicialmente descritas em 1930 por *Castellani*, porém utilizando a denominação de gênero *Hartmannella* e da espécie *Hartmannella castellanii*. Volkonsky, em 1931, dividiu o gênero *Hartmannella* em três subgêneros: *Hartmannella*, *Glaeseria* e *Acanthamoeba*.

Após duas décadas, Singh (1952), Pussard (1966) e Singh e Das (1970), questionaram a classificação dessas amebas e após avaliar diversas cepas de *Hartmannella* e *Acanthamoeba*, Page (1967) concluiu que a formada classificação estabelecida era duvidosa na diferenciação de espécies, porém, que a presença de acantopódios e as características dos cistos eram suficientes para uma proposta de classificação do gênero baseada nas características morfológicas. Em 1975, Sawyer e Griffin estabeleceram uma nova classificação filogenética incluindo a família Acanthamoebidae (KHAN, NAVEED AHMED, 2006). Em 1988, o gênero *Hartmannella* foi alocado na família Hartmannellidae estabeleceu-se a atual classificação filogenética das AVLs (Figura 1).

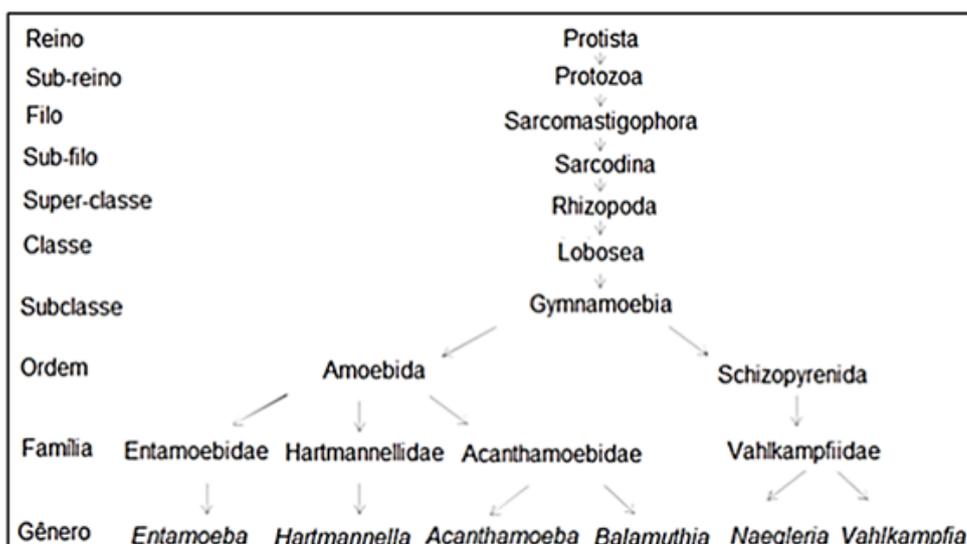


Figura 1: **Atual classificação filogenética de *Acanthamoeba* em relação às outras amebas de vida livre.** Fonte: adaptado de KHAN, 2006.

Aproximadamente, 25 espécies de *Acanthamoeba* são descritas com base na morfologia dos cistos proposta pela classificação tradicional. Porém, ainda assim, a variedade morfológica e as alterações decorrentes das condições de cultura em uma determinada cepa podem dificultar ou impedir a identificação.(SIDDIQUI; KHAN, 2012).

Com isso, uma classificação simplificada foi adotada, permitindo categorizar os isolados em grupos I, II, e III, de acordo com o tamanho do cisto e a morfologia do endocisto e ectocisto (PUSSARD, M.; PONS, 1977)(**Figura 2**).

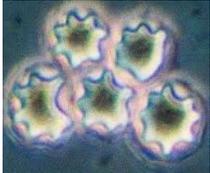
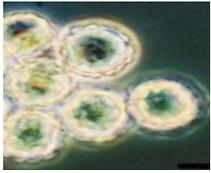
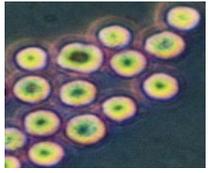
Grupo	I	II	III
Diâmetro	16 a 30 μ m	\leq a 18 μ m	\leq a 18 μ m
Forma do endocisto	Aspecto estrelado, braços bem visíveis	Levemente estrelado, oval ou poliédrico	Oval ou levemente angular
Forma do ectocisto	Contorno circular, liso ou ondulado	Segue o contorno do Endocisto.	Fino e liso ou fracamente ondulado
Forma microscópica observada			

Figura 2:Esquema comparativo dos grupos morfológicos de *Acanthamoeba*.Classificação baseada na morfologia dos cistos dos 3 diferentes grupos de *Acanthamoeba*. Fonte: modificado de QVARNSTROM et al., 2009.

Basicamente, espécies pertencentes ao grupo I apresentam cistos grandes (acima de 16-18 μ m de diâmetro), caracterizados pela forma estrelada do endocisto e a parede externa é esférica e lisa (APARECIDA DA SILVA; ARISTEU DA ROSA, 2003; MARCIANO-CABRAL *et al.*, 2003). Já as espécies do grupo II apresentam cistos de tamanho médio menor que 18 μ m, sendo que

o endocisto pode apresentar-se de forma estrelada, oval, triangular ou quadrangular. Já o ectocisto segue o contorno do endocisto e é geralmente rugoso (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004a; WALOCHNIK; OBWALLER; ASPÖCK, 2000).

O grupo III compreende as espécies que também possuem tamanho médio menor que 18 μm , com endocisto de forma oval ou globosa, nunca estrelado. O ectocisto delgado e liso é justaposto ao endocisto e, às vezes, difícil de ser observado (PUSSARD, PONS, 1977; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004a).

Embora a morfologia de grupos ainda seja utilizada na identificação dos isolados, estudos moleculares com foco nas sequências da pequena subunidade de genes nucleares 18S rRNA são atualmente a principal ferramenta para caracterização taxonômica de *Acanthamoeba* (FUERST; BOOTON; CRARY, 2015).

A existência de 12 genótipos foi relatada após analisar essa sequência em 53 isolados (STOTHARD *et al.*, 1998). Até então, um total de 20 genótipos foram descritos (CORSARO *et al.*, 2015; MAGNET *et al.*, 2014).

Cada genótipo exibe ao menos 5% de divergência genética dos outros genótipos e existem 12 regiões variáveis na região 18S do rRNA, sendo que todas devem ser consideradas para a determinação de um novo genótipo (CORSARO; VENDITTI, 2010). Essa classificação genotípica permite associar alguns a um maior potencial em causar infecções. Dos genótipos isolados e descritos, o genótipo T4 é o mais frequentemente envolvido em casos clínicos de ceratite e encefalite (MACIVER *et al.*, 2013).

As causas para essa prevalência são incertas, entretanto, acredita-se que amebas desse genótipo possuam maior virulência e propriedades que aumentam sua capacidade de infecção, assim como maior resistência a agentes quimioterápicos.

2.2. Morfologia e biologia de *Acanthamoeba*

As amebas do gênero *Acanthamoeba* apresentam duas formas evolutivas em

seu ciclo de vida: a fase do cisto, com uma mínima atividade metabólica, e a fase do trofozoíto que apresenta um crescimento vegetativo (**Figura 3**) (SIDDIQUI e KHAN, 2012). Ambas as fases podem ser encontradas nos ambientes e em tecidos infectados (YUEHUA *et al.*, 2014).

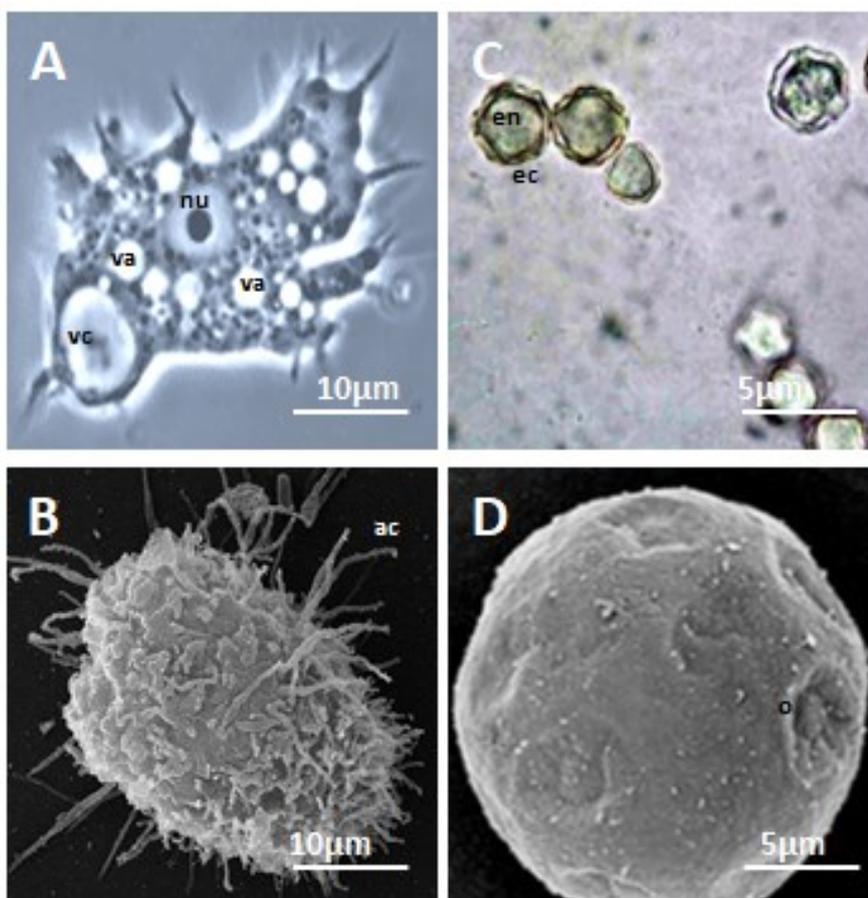


Figura 3: Formas evolutivas de *Acanthamoeba* spp: A. Trofozoíto em microscopia de contraste de fase com vacúolo contrátil (vc), vacúolos alimentares (va) e núcleo (n). B. Trofozoíto em microscopia eletrônica de varredura com acantopódios evidentes (ac). C. Cistos em cultura axênica em microscopia óptica convencional com ectocisto (ec) e endocisto (en) evidentes. D. Cistos em microscopia eletrônica de varredura com ostíolos evidentes (o). Fonte: autoria própria.

As formas ativas de *Acanthamoeba* são os trofozoítos, que são pleiomórficos, emitem pseudópodes finos de forma afilada, denominados acantopódios, que são estruturas características do gênero (**Figura 3 A e B**). Os trofozoítos variam em tamanho, que pode ser de 14 a 40 μm de diâmetro, (KINDE *et al.*, 2007). O citoplasma do trofozoíto é abundante e granuloso, com

movimentos polidirecionais. Ele apresenta diversos vacúolos digestivos com um ou dois deles representando vacúolo contrátil responsável pelo controle osmótico da célula (LLOYD; MELLOR; WILLIAMS, 1983; VAN WAEYENBERGHE *et al.*, 2013)(**Figura 3 A e B**). Os trofozoítos se multiplicam assexuadamente por fissão binária, processo que se inicia quando os trofozoítos se dividem ao atingir certo tamanho. O corpo celular torna-se esférico e coberto por pseudópodos curtos, que depois se alonga e finalmente o organismo divide-se em duas partes. Sendo que, enquanto isso, o núcleo já se dividiu por mitose(YOUSUF; SIDDIQUI; KHAN, 2013).

A locomoção, adesão e captura de microrganismos envolve a ação de pseudópodes emitidos pelos trofozoítos que utilizam para se alimentar de bactérias, fungos, leveduras, matéria orgânica, vírus e algas, além de outras partículas do substrato. Eles podem sobreviver em cultivo axênico e ingerir nutrientes líquidos por meio da pinocitose (BOWERS; KORN, 1968; KHAN *et al.*, 2006).

Os cistos são observados em condições adversas, como alta temperatura, dessecação, falta de nutrientes e presença de alguns agentes químicos (desinfetante e antimicrobiano) e físicos (calor, frio e radiação ultravioleta). São, portanto, considerados as formas de resistência do microrganismo (AKSOZEK *et al.*, 2002). O cisto possui tamanho de 10-20 μm aproximadamente e apresentam parede externa dupla composta pelo ectocisto, forma mais esférica, e endocisto, que apresenta formas variáveis de triangulares a estrelares, com junções entre as duas camadas, evidenciando estruturas chamadas de ostíolos, que são poros existentes na parede do cisto(**Figura 3 C e D**).(PAGE, 1988; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004a).

A composição do cisto inclui aproximadamente 35% de carboidratos, sendo a celulose o principal açúcar, 33% de proteínas, 6% de lipídios e outros materiais não identificados (SIDDIQUI; KHAN, 2012). A membrana plasmática é constituída por aproximadamente 33% de proteínas, 25% de fosfolipídios, 13% de esteróis e 29% lipofosfoglicanos. (DEARBORN; KORN, 1974; SIDDIQUI; KHAN, 2012; SMITH; KORN, 1968). Sua formação envolve a ação da serinoprotease CSP21 que é uma proteína específica envolvida no processo de revestimento do trofozoíto durante o encistamento. O desencistamento, por sua

vez, ocorre quando o cisto é exposto a condições ideais de crescimento para o trofozoíto, sendo essas alterações ambientais detectadas através de poros existentes na parede do cisto, conhecidos como ostíolos. O trofozoíto deixa então o cisto, separando-se da parede que o protegia, completando o ciclo (KHAN, NAVEED AHMED, 2006).

2.3 Infecções causadas por *Acanthamoeba*

As amebas do gênero *Acanthamoeba* podem causar em humanos dois tipos principais de infecções: uma em que as amebas infectam o hospedeiro por meio de lesões cutâneas ou pelo trato respiratório, se disseminando por via hematogênica até o encéfalo e outra constituída por infecção da córnea.

O primeiro tipo determina quadros que afetam a nasofaringe, o ouvido, a pele (acantamebíase cutânea), com posterior disseminação, estando associado a indivíduos imunocomprometidos por meio de infecções por HIV (DOWELL *et al.*, 2015), tratamento com imunossupressor após transplante de órgãos, alcoolismo, abuso de drogas, tratamento com esteroides, quimioterapia e radioterapia para tumores malignos (CHOMICZ *et al.*, 2010). Portadores de outras doenças como diabetes, Lupus Eritematoso Sistêmico (THAMTAM *et al.*, 2016), insuficiência renal, cirrose, tuberculose, úlcera na pele e doença de Hodgkin também são afetados, devido a uma queda no sistema imunológico que favorece o crescimento e disseminação destas amebas (DA ROCHA-AZEVEDO; TANOWITZ; MARCIANO-CABRAL, 2009).

O segundo tipo de infecção por *Acanthamoeba*, a Ceratite Amebiana (CA), não tem relação com imunossupressão. O aumento da sua incidência nas últimas décadas é atribuído à popularização de lentes de contato (KHAN *et al.*, 2006; RADFORD; MINASSIAN; DART, 2002).

2.3.1 Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG)

A Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG), é uma doença de progressão lenta e é quase sempre fatal, com uma taxa de mortalidade de 85% (TORNO *et al.*, 2000; ZAMORA; HENDERSON; SWIATLO, 2014). A EAG se

desenvolve quando as amebas que infectaram o indivíduo por via cutânea ou respiratória, atravessam a barreira hematoencefálica e atingem o encéfalo. Embora esse primeiro tipo de infecção por *Acanthamoeba* ocorra prioritariamente em imunocomprometidos, há alguns relatos de casos em pacientes sem sinais de imunodepressão (DA ROCHA-AZEVEDO; TANOWITZ; MARCIANO-CABRAL, 2009).

Os sintomas incluem dor de cabeça, febre, alterações comportamentais, hemiparesia, letargia, rigidez de nuca, afasia, ataxia, vômitos, náuseas, paralisia do nervo craniano, aumento da pressão intracraniana, convulsões e finalmente a morte. O óbito é devido à hemorragia, lesões necróticas com irritação meníngea grave e encefalite (KHAN *et al.*, 2006).

Seu diagnóstico definitivo pode ser estabelecido pela associação de dados clínicos e exames complementares como exame no líquido cefalorraquidiano (LCR); (KINDE *et al.*, 2007), feito pela visualização dos trofozoítos ou cistos através da coloração de Gram, Giemsa, hematoxilina e eosina, porém estas colorações não diferem as os protozoários de macrófagos, por exemplo. A melhor maneira para identificação das amebas seria através da morfologia da parede dos cistos e da forma nuclear e dos vacúolos do trofozoítos (CALIOT *et al.*, 2017).

O protozoário pode ainda ser cultivado facilmente *in vitro* em meios especiais. Os altos títulos de anticorpos específicos para detecção de *Acanthamoeba* soro de pacientes são indicativos de infecção por EAG, porém o fato de poder existir um alto índice de anticorpos em indivíduos saudáveis devido ao constante contato entre humanos e amebas, impede que a sorologia seja utilizada na rotina diagnóstica (ZAMORA; HENDERSON; SWIATLO, 2014).

Técnicas moleculares também podem ser usadas no diagnóstico, porém estas apresentam alto custo e são de acesso limitado (DA ROCHA-AZEVEDO; TANOWITZ; MARCIANO-CABRAL, 2009). Não existe um tratamento eficaz e recomendado, uma vez que as amebas apresentam baixa sensibilidade a agentes antimicrobianos e muitos destes agentes são incapazes de atravessar a barreira hematoencefálica, no sistema nervoso central. A terapia é realizada através da combinação de antimicrobianos, antifúngicos e anti-inflamatórios.

(KHAN *et al.*, 2006; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

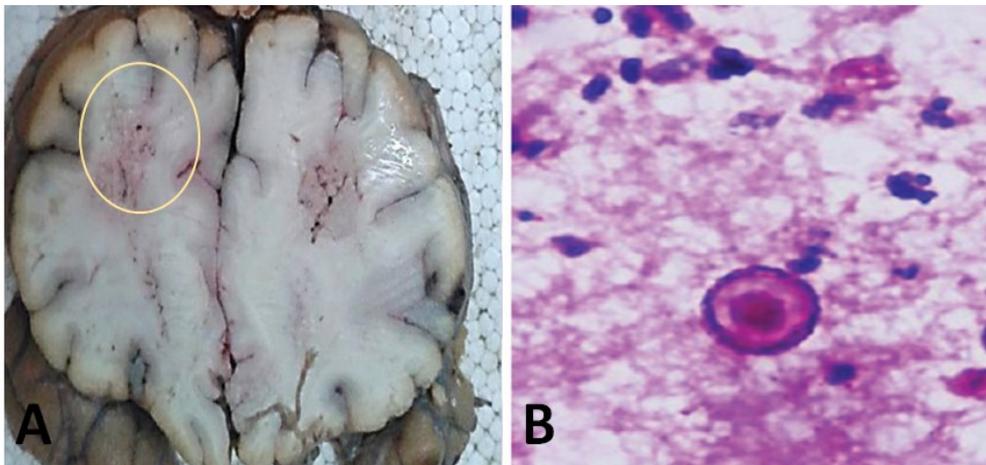


Figura 4:Encefalite amebiana granulomatosa. Relato de caso de um paciente de 28 anos diagnosticado com Lupus eritematosa sistêmico e EAG. A: Pequenas áreas necróticas macroscópicas (círculo amarelo). B: forma do cisto de *Acanthamoeba* evidenciando a parede enrugada. Fonte: THAMTAM *et al.*, 2016

2.3.2 Ceratite Amebiana

A ceratite por *Acanthamoeba* é uma doença de reconhecimento relativamente recente e nas últimas décadas, caracterizada pela destruição progressiva da córnea causada pela invasão por *Acanthamoeba*, podendo ser uni ou bilateral (CLARKE; ALIZADEH; NIEDERKORN, 2006).

No Brasil, os primeiros casos foram descritos por Nosé *et al.* em 1988. A infecção se desenvolve em pessoas imunocompetentes e foi ligada principalmente às espécies: *A. polyphaga*, *A. Castellani*, *A. rhyssodes*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. astronyxis*, *A. quina* e *A. lugdunensis* (KHAN *et al.*, 2003). O seu manejo clínico tem sido motivo de vários estudos, sendo considerada uma infecção de difícil diagnóstico e tratamento (WALOCHNIK *et al.*, 2000; KHAN *et al.*, 2003).

Dentre os fatores de risco para a infecção, os principais são os danos pré-existentes na córnea, que podem ocorrer por traumas com objetos estranhos como iodo, terra e lentes de contato. O uso das lentes é o principal fator de risco para CA, especialmente quando há falha no processo de higienização das lentes de contato de uso diário. O uso de soluções salinas

caseiras, produzidas com sal de cozinha para a limpeza das lentes de contato apresentou-se como um fator de risco importante no desenvolvimento dos primeiros casos (SIDDIQUI; KHAN, 2012). Testes em lentes de contato usadas mostraram a presença de diversos sacarídeos após apenas 30 minutos de uso, que podem agir como receptores para trofozoítos de *Acanthamoeba*, aumentando a probabilidade de ocorrer ligação das amebas às lentes de contato. (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004b).

O quadro clínico, inicialmente, pode ser confundido com outras infecções da córnea, causadas por diferentes microrganismos, podendo levar a erro no diagnóstico. A ceratite dendrítica resultante do vírus herpes simplex ou adenovírus apresenta características similares a CA (BROWN *et al.*, 2017; DA ROCHA-AZEVEDO; TANOWITZ; MARCIANO-CABRAL, 2009). Na fase avançada, a infecção se assemelha a um quadro clínico de ceratite fúngica ou uma úlcera da córnea. Também é possível confundir o diagnóstico da CA com ceratite bacteriana, já que ambas apresentam sintomatologia semelhante (RETANA-MOREIRA *et al.*, 2015; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

Os principais sintomas da doença são olhos avermelhados, lacrimejamento, fotofobia, dor e edema na pálpebra. Uma constante hiperemia conjuntival e inflamação na córnea também podem ocorrer (**Figura 5**).

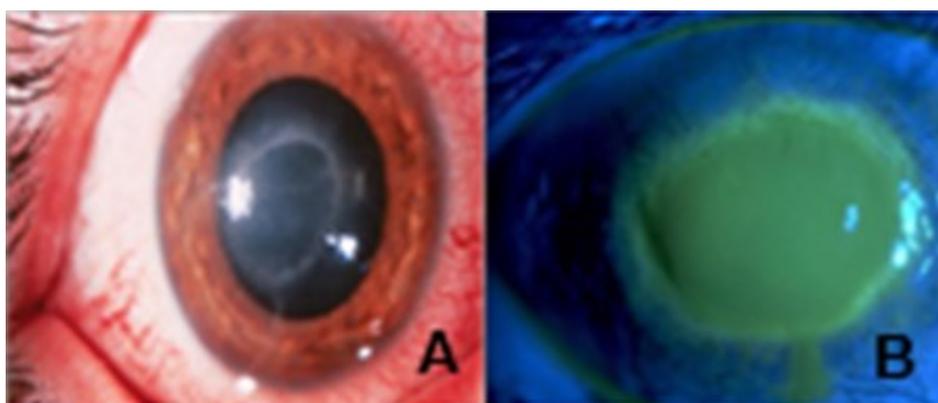


Figura 5: Lesões características de Ceratite Amebiana.: A: Infiltrado em forma de anel, característico em CA. B: Lesões na córnea após a aplicação do corante fluoresceína de sódio (LORENZO-MORALES *et. al.*, 2015).

Quando trofozoítos infiltram os nervos da córnea, pode ocorrer um quadro de neurite e necrose. Coriorretinite ocorre raramente em casos que o

parasita invade a retina.

No início da infecção, as amebas ficam restritas ao epitélio da córnea, mas progridem e invadem o estroma, onde provocam grande inflamação. O achado clínico mais característico é a presença de um infiltrado inflamatório estromal em forma de anel, constituído principalmente por neutrófilos (ERTABAKLAR *et al.*, 2009; KINDE *et al.*, 2007; MARCIANO-CABRAL *et al.*, 2003). Deste modo, os trofozoítos se ligam à glicoproteínas de manose presentes no epitélio da córnea hospedeira através da proteína ligadora de manose (MBP) de 136 kDa da membrana trofozoítica (**Figura 6 A**). Microtraumas levam ao aumento da expressão de glicoproteínas de manose no epitélio da córnea, sendo esse um fator de risco determinante para a instalação da doença.

A exposição de trofozoítos de *Acanthamoeba* a manose induz aumento da expressão de uma protease de 133kDa, conhecida como MIP133. A MIP133 é um fator citopático que atua pela indução de apoptose em queratinócitos, células do corpo ciliar, células epiteliais do pigmento de retina, células do epitélio da córnea e células endoteliais da córnea (**Figura 6 B e C**) (CLARKE, DANIEL W.; NIEDERKORN, 2006b). Uma intensa dor é relatada por pacientes com CA e acredita-se que seja devido à produção da Ceratoneurite radial causada pelo acúmulo dos trofozoítos próximos aos nervos da córnea (**Figura 6 E**). Os trofozoítos em sua maioria não penetram a nível intraocular (**Figura 6 F**). Clarke e colaboradores (2005), em experimentos *in vivo*, demonstraram que os trofozoítos que conseguem penetrar a esse nível são eliminados por um intenso infiltrado inflamatório. As proteases são fatores de virulência já identificados em diversos microrganismos como vírus, bactérias e protozoários. Os trofozoítos de *Acanthamoeba* utilizam proteases, tais como serinoproteases, cisteína proteases, elastase e metaloproteases, para invadir o estroma (**Figura 6 D**) (CLARKE; NIEDERKORN, 2006). Proteases secretadas por *Acanthamoeba* apresentam capacidade de degradar diversos componentes da matriz extracelular. Kong e colaboradores (2000) identificaram uma serinoprotease de 33kDa em uma cepa do genótipo T12, com a capacidade de degradar fibrinogênio, IgG, IgA, albumina, hemoglobina, além de também degradar os principais componentes da matriz extracelular: colágeno tipo I,

colágeno tipo IV e fibronectina. Cepas patogênicas exibem proteases específicas, como o ativador de plasminogênio de 40 kDa, que não são encontradas em cepas ambientais (MITRO *et al.*, 1994). As metaloproteases de matriz são enzimas proteolíticas que também possuem papel importante para a degradação de componentes da matriz extracelular no processo de invasão por *Acanthamoeba* (CLARKE; NIEDERKORN, 2006). Nesse contexto, as proteases em *Acanthamoeba* são fundamentais para que essa ameba de vida livre obtenha sucesso ao infectar e colonizar um hospedeiro. No entanto, ainda existem muitos fatores do mecanismo molecular que regula a patogenicidade em *Acanthamoeba* que necessitam de um maior entendimento.

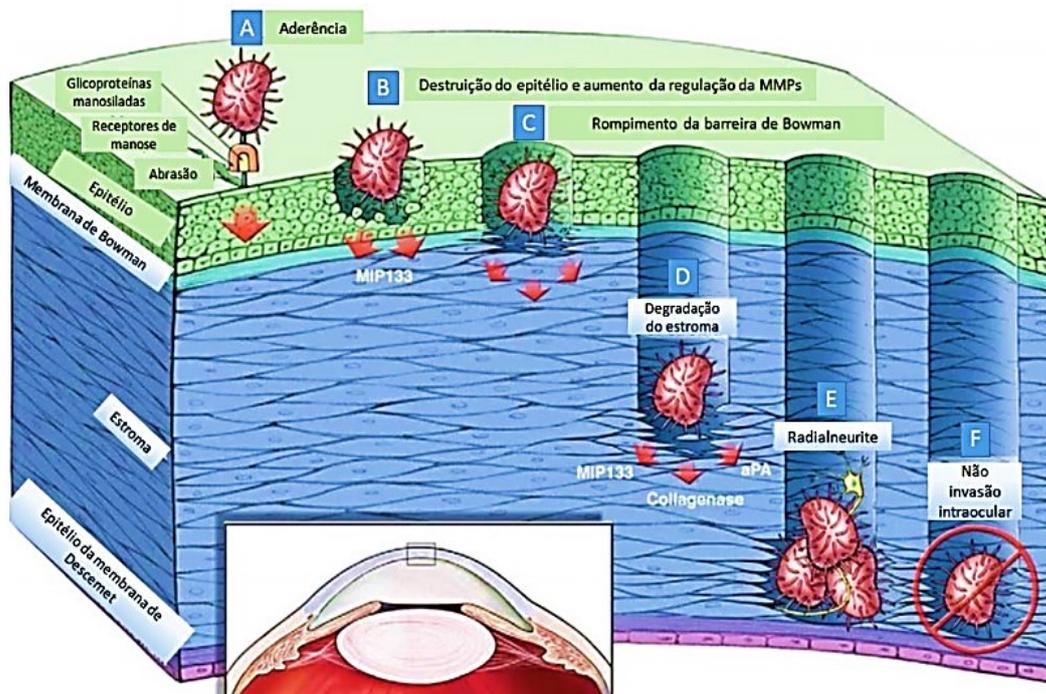


Figura 6: O processo de invasão da córnea por *Acanthamoeba*. A) Os trofozoítos aderem ao epitélio da córnea. B) Destruição do epitélio pela ação da protease MIP133. C) Rompimento da membrana de Bowman e invasão do estroma. D) Degradação do estroma pela ação de diversas proteases. E) Acúmulo de trofozoítos próximos ao nervo da córnea causando ceratoneurite. F) Incapacidade dos trofozoítos em penetrar a nível intraocular. Fonte: adaptado de CLARK; NIEDERKORN, 2006).

Um método de diagnóstico rápido e eficaz ainda é necessário para o manejo de casos de CA. A confirmação da infecção muitas vezes só é realizada pela biópsia ou raspado da córnea, o que pode acontecer após a

retirada da córnea (RETANA-MOREIRA *et al.*, 2015; SCHAUMBERG; SNOW; DANA, 1998).

Mesmo após o diagnóstico correto, ainda há dificuldade em encontrar o tratamento eficaz, uma vez que cistos de amebas são extremamente resistentes à ação de fármacos e agente químicos (SCHAUMBERG; SNOW; DANA, 1998).

2.3.3. Tratamento das infecções causadas por *Acanthamoeba*

O tratamento para a acantamebíase deve ser iniciado imediatamente após o diagnóstico e até mesmo suspeita clínica, por ser uma infecção difícil de tratar e estar associadas a prognósticos ruins do paciente, como deficiência visual em caso da CAeóbito em caso de EAG.

Os principais objetivos do tratamento incluem reduzir a carga parasitária, inibir o crescimento do microrganismo e impedir a invasão dos tecidos do hospedeiro (KHAN, 2006).

A farmacoterapia adotada deve ser combinada considerando a resistência do protozoário às drogas utilizadas. Os componentes da dupla parede dos cistos de *Acanthamoeba* atuam como uma barreira física natural que impede a absorção dos fármacos.

A miltefosina, composto utilizado para o tratamento de câncer e leishmaniose, pode ser utilizada para o tratamento (WALOCHNIK *et al.*, 2002). As biguanidas são capazes de destruir a membrana plasmática do trofozoíto (SEAL, 2003). Enquanto as diamidinas, por sua vez, não possuem mecanismo de ação completamente elucidado. Entretanto, o uso combinado das duas drogas apresenta um mecanismo de ação eficaz no tratamento. O uso de antibióticos como bezetacil, anfotericina B e tetraciclina associados a corticóides também são eficazes, mas muitas vezes apresentam alta toxicidade ao paciente.

Dentre os benefícios do uso de corticosteroides para o tratamento da CA por *Acanthamoeba*, estão o alívio da dor e a melhoria da visão a curto e longo prazo (PARQUE *et al.*, 2014). Entretanto, a diminuição da resposta imune causada pelo uso desses medicamentos pode piorar o quadro visto

quemacrófagos e neutrófilos são capazes de eliminar facilmente os trofozoítos de *Acanthamoeba* (KHAN, 2006).

Um exemplo clássico da dificuldade no tratamento consiste no regime de rígido no tratamento da CA, que é demonstrado pelo fato das soluções tópicas serem administradas em intervalos inferiores de 1 hora em alguns casos. Ele também é muito longo, podendo demorar até um ano para ser concluído, o que pode gerar completo desconforto e perda da qualidade de vida do paciente, além de custos financeiros (KHAN, 2006).

A busca de novos agentes amebicidas é muito importante para melhorar o tratamento para amebíase. Atualmente, têm sido testados extratos vegetais com essa finalidade que apresentam baixa toxicidade a células humanas e alta efetividade contra cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba*. Além disso, os avanços das técnicas de biologia molecular para encontrar biomarcadores e entender a patogenicidade de *Acanthamoeba* podem servir como alvo terapêutico (SIDDIQUI *et al.*, 2016).

2.4 Patogenicidade de *Acanthamoeba*

Embora as manifestações clínicas das infecções acometidas por *Acanthamoeba* são bem descritas, os mecanismos precisos associados com a patogênese da *Acanthamoeba* não foram totalmente esclarecidos. Compreender a base da patogenicidade da *Acanthamoeba* é crucial para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas. É bem estabelecido que a patogenicidade seja um processo complexo que envolve múltiplos fatores, tanto voltado em parte pelo parasita quanto em parte pelo hospedeiro, e não há um determinante único que cause ou que permita que esses parasitas produzam essas doenças em humanos.

Os fatores conhecidos voltados à patogênese são os mecanismos indiretos e diretos, tanto dependente quanto independente de contato entre a ameba e o tecido do receptor, ligados também às características intrínsecas do hospedeiro.

2.4.1 Mecanismos indiretos

I. Morfologia: As diferentes formas de vida apresentadas por *Acanthamoeba* (cistos e trofozoítos) são consideradas mecanismos associados ao poder patogênico deste organismo (DEARBORN; KORN, 1974). O trofozoíto é um fagócito capaz de fagocitar células, processo importante tanto na sobrevivência no ambiente, habilitando-o a incorporar partículas alimentares e outros microrganismos, quanto na patogênese das infecções, por sua habilidade de engolfar partes celulares por formação amebostomos. Além disso, sua forma de resistência conhecida como cistos podem manter sua integridade e conservar a patogenicidade durante vários anos em condições adversas, sendo este um importante fator na propagação de infecções causadas por esta ameba. A capacidade de rápida transformação em cistos tem sido também considerada um fator de patogenicidade (ROCHA AZEVEDO *et al.*, 2009). O encistamento nos tecidos infectados também é considerado uma importante forma de *Acanthamoeba* resistir ao sistema de defesa do hospedeiro, sobrevivendo a mecanismos inflamatórios e ao uso de para combater a infecção (SIDDIQUI *et al.*, 2009).

II. Tolerância à temperatura e osmolaridade e diferentes pHs: Ao estabelecer infecções sistêmicas ou encefalite, *Acanthamoeba* é exposta a temperaturas maiores do que habitualmente enfrenta no ambiente. De forma similar, na ceratite amebiana, as amebas são expostas à alta osmolaridade representada pela salinidade da lágrima. Portanto, o crescimento a altas temperaturas e a alta osmolaridade é descrito como características associadas à patogenicidade de *Acanthamoeba* em se estabelecer no hospedeiro (WALOCHNIK *et al.*, 2000; KHAN *et al.*, 2001; KHAN *et al.*, 2002). Além disso, *Acanthamoeba* pode crescer em faixas de pH de 4 a 12 (KHAN *et al.*, 2006), evidenciando uma alta adaptabilidade a condições extremas.

III. Resistência a substâncias químicas: Os trofozoítos de *Acanthamoeba* são considerados sensíveis a uma variedade de compostos usados para o tratamento de infecções, incluindo agentes químicos desinfetantes, como as biguanidinas, compostos quartenários de amônia, cloro, dióxido de cloro e peróxido de hidrogênio (KHAN, 2003). Em relação aos cistos, essa resistência é aumentada, o que, inclusive, constitui um dos problemas no tratamento das

infecções, já que as amebas adotam essa forma também nos tecidos afetados.

2.4.3 Mecanismos diretos

I. Adesão: A adesão é um mecanismo dependente de contato considerado o primeiro passo durante a patogênese das infecções por *Acanthamoeba*, uma vez que os trofozoitos utilizam da aderência em células hospedeiras mediadas por uma adesina, isto é, uma proteína de ligação à manose (MBP) presente na superfície do trofozoito para prosseguir sua invasão para tecidos mais profundos das células epiteliais da córnea.

II. Fagocitose e apoptose: A fagocitose em *Acanthamoeba* foi demonstrada utilizando uma variedade de partículas, incluindo esferas de látex, bactérias e leveduras. Recentemente foi demonstrada também a capacidade da ameba em digerir células epiteliais da córnea, através de estruturas presente na superfície do trofozoito semelhantes a estruturas vistas em outros protozoários, tais como *Naegleria e E. histolytica*. Vários estudos sugerem que *Acanthamoeba* induz apoptose em células de neuroblastoma que representam ainda outro mecanismo de morte celular do hospedeiro (SIDIQI *et al* 2011)]. Eles observaram que o DNA da célula hospedeira apresentava uma cromatina condensada, formação de membranas e formação de corpos apoptóticos, todos esses marcadores bem conhecidos em condições de apoptose. Contudo, se apoptose e fagocitose têm papéis independentes na patogênese das infecções por *Acanthamoeba* ou se a apoptose é um processo primário, que é estimulado pela ligação de parasitas com as células hospedeiras e leva a eventos secundários, como a fagocitose ainda permanece desconhecida (SIDIQI *et al.*,2011).

III. Ecto-ATPases: As Ecto-ATPases são glicoproteínas presentes na membrana plasmática. Quando estas proteínas extracelulares são hidrolisadas o ADP (Adenosina difosfatada) é formado (SISSON *et al.*, 2004). Este ADP pode ter efeitos tóxicos nas células hospedeiras, sugerindo que as ATPases possuem um importante papel na patogenese de *Acanthamoeba*.

IV. Secreção de proteases: As proteases são produzidas por vários microrganismos como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e são capazes de produzir danos à membrana da célula do hospedeiro facilitando a migração durante a infecção. Grandes quantidades dessas proteases são secretadas por cepas *Acanthamoeba*, sendo que as amebas de origem clínica produzem maior quantidade que as ambientais (KHAN, 2006; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015). O principal papel fisiológico das proteases é a degradação do substrato (KHAN, 2006), o que justifica o fato de serem observados em outras amebas de vida livre potencialmente patogênica, como *Naegleria*, *Balamuthia*, *Entamoeba* (KLEMBA & GOLDBERG, 2002). As proteases também são consideradas um fator de virulência relevante na invasão de tecidos, migração do patógeno e no desenvolvimento da patologia no hospedeiro (KHAN *et al.*, 2000; KOESHLER *et al.*, 2009; OMANA-MOLINA *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2015).

2.5 Atividade imunológica em infecções por *Acanthamoeba*

Anteriormente, foram descritos os diversos fatores de patogenia capazes de modular a resposta imunológica do hospedeiro por *Acanthamoeba*. Os mecanismos de defesa empregados pelo organismo estão diretamente associados aos mecanismos de citólise e ativação celular, tanto de macrófagos, como de neutrófilos, mediados pelo Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). A presença de anticorpos específicos favorece a produção de interferon gamma (IFN- γ) (VAN KLINK *et al.*, 1996).

Os macrófagos atuam como primeira linha de defesa na eliminação dos trofozoítos, uma vez que foi observado que a sua ausência nos tecidos infectados favorece o aumento da incidência da infecção pelas amebas, agravando a enfermidade e determinando o prolongamento do curso clínico da ceratite (STEWART *et al.*, 1992). Ainda não é bem elucidado o papel dos neutrófilos frente à infecção, mas sabe-se que essas células são tão importantes quanto os macrófagos na fase inicial de invasão celular considerando que também são encontrados em número elevado em úlceras

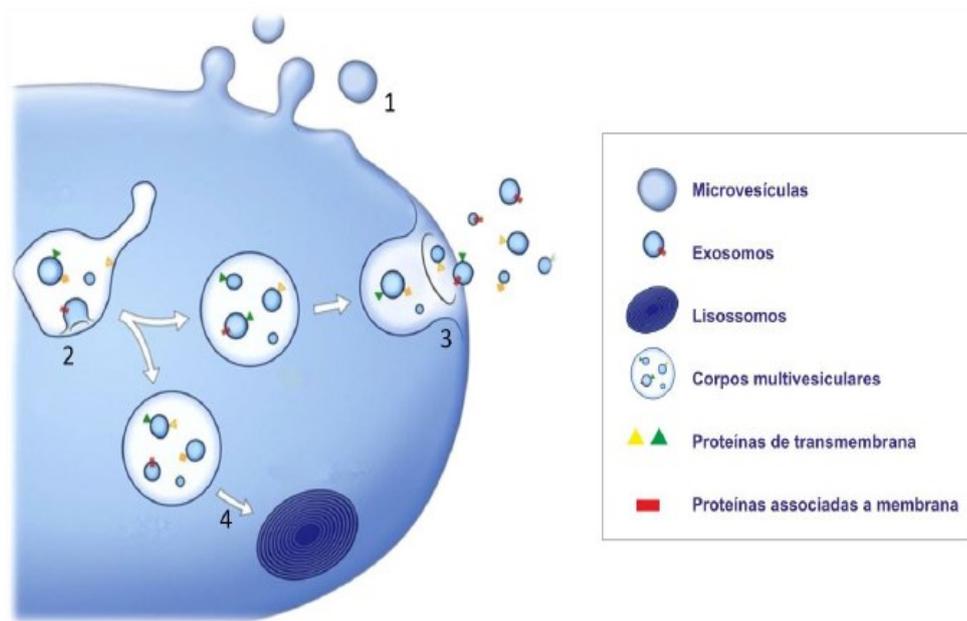
cutâneas e em córneas de pacientes com ceratite. Acredita-se que sua atividade seja influenciada pela presença do TNF- α (FERRANTE, 1991).

Baseado nesses indícios já foi possível determinar que sua atuação apresente um excelente desempenho na eliminação de *Acanthamoeba* durante a infecção da córnea, através de estudos envolvendo animais de experimentação, nos quais a diminuição significativa do número de neutrófilos está diretamente proporcional ao aparecimento precoce da doença e a sua forma mais agravada, enquanto o aumento dos neutrófilos levou a uma melhora dos animais (HURT *et al.*, 2003). Experimentos *in vitro* mostram que os anticorpos específicos são capazes de ativar o mecanismo lítico do complemento, porém tem se observado que mesmo que esses anticorpos sejam ausentes, os trofozoítos de *Acanthamoeba* são capazes de ativar o mecanismo da cascata do complemento. Isto é possível, por causa da presença de proteínas reguladoras do complemento, como a CD55, na composição da lágrima e do epitélio corneal, que protegem o tecido dos trofozoítos de *Acanthamoeba* (FERRANTE e ROWN-KELLY, 1983; TONEY e MARCIANO-CABRAL, 1998). Estudos abordando a resposta imune após o contato com trofozoítos de *Acanthamoeba*, *in vivo* e *in vitro*, indicaram aumento na expressão de mRNA de TLR4, MyD88, IL-8, TNF- α , IL-12 e NF- κ B nas células da córnea de ratos infectadas (REN *et al.*, 2010; REN & WU, 2011).

Em outros estudos, houve uma expressão aumentada de TLR4 / TLR2 no cérebro, pulmões e olhos de camundongos infectados por *Acanthamoeba* cerebral e sistêmica. Os dados indicaram que a presença de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de *Acanthamoeba* são reconhecidos pelo hospedeiro (DERDA *et al.*, 2016; WOJTKOWIAK-GIERA *et al.*, 2016; KOT *et al.*, 2019). As proteases produzidas pelos trofozoítos são capazes de induzir a produção de IL-12 e IL-6 em macrófagos murinos (CANO *et al.*, 2019). Os mecanismos envolvidos na liberação de proteases na matriz extracelular podem incluir a liberação direta pelos parasitas ou compartimentadas em vesículas.

2.6 Vesículas extracelulares

As vesículas extracelulares (VEs) são estruturas membranares produzidas e liberadas por vários tipos celulares. Existem três tipos principais de vesículas extracelulares: os corpos apoptóticos, as microvesículas e os exossomos.



(Figura 7).

Figura 7: Liberação de microvesículas e exossomos. As MVs originam-se diretamente por brotamento da membrana plasmática (1). Os exossomos, por sua vez, são formados no interior de corpos multivesiculares (MVBs) por invaginação das membranas de endossomos precoces (2). Os exossomos são liberados pela fusão de MVBs com a membrana plasmática (3). MVBs podem sofrer fusão com lisossomos (4). Símbolos representativos indicados no quadro à direita (Modificado de Raposo, G. 2013).

Os corpos apoptóticos apresentam o tamanho de 1 a 5 μm e a sua liberação já é bem conhecida em células danificadas ou em apoptose (HRISTOV *et al.*, 2004). Embora os corpos apoptóticos sejam bem descritos em células danificadas, apenas recentemente a produção de VEs por células viáveis ou normais tem sido descrita. Neste contexto as microvesículas (MV) e os exossomos apresentam uma maior relevância, considerando que a sua produção seja um aspecto do metabolismo regular das células viáveis. Conceitualmente, a classificação é baseada quanto ao seu tamanho, origem e

conteúdo. Enquanto as MVs são liberadas a partir da membrana plasmática e apresenta o tamanho de 100nm a 1µm de diâmetro (RAPOSO; STOOORVOGEL, 2013), os exossomos variam o tamanho entre 30 a 150 nanômetros e possuem uma origem endocítica, sendo liberados após a fusão de corpos multivesiculares com a membrana (STOOORVOGEL *et al.*, 2002). Além da sobreposição de tamanho entre estas duas classes, diferenças em propriedades tais como a morfologia, densidade flutuante e composição são insuficientes para uma distinção clara entre elas (BOBRIE *et al.*, 2011). Além da sobreposição de tamanho entre estas duas classes, diferenças em propriedades tais como a morfologia, densidade flutuante e composição são insuficientes para uma distinção clara entre elas (BOBRIE *et al.*, 2011).

2.6.1 Interação e função das VEs

As funções das VEs em processos fisiológicos ou patológicos dependem da sua capacidade de interagir com as células-alvo e o tipo de célula que produz (**Figura 8**). Sua produção já foi demonstrada em diferentes organismos e circunstâncias diferentes (BARTENEVA; MALTSEV; VOROBBJEV, 2013).

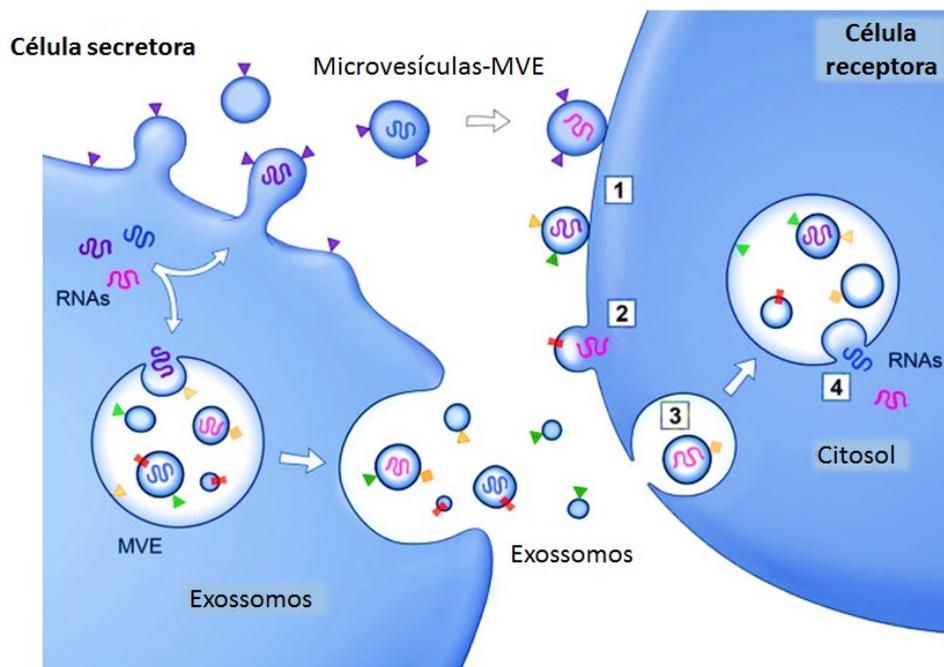


Figura 8:Esquema de transferência de estruturas por VEs. As proteínas associadas à membrana (triângulos), as transmembranares (retângulos) e RNAs (retas sigmóides) são seletivamente incorporados em VEs. As VEs podem encaixar na membrana plasmática de

uma célula-alvo (1). As vesículas ligadas podem fundir-se diretamente com a membrana plasmática (2) ou ser endocitados (3). As vesículas endocitadas podem fundir-se com a membrana de um compartimento endocítico (4). Ambas as vias resultam na liberação de proteínas e RNAs na membrana ou citosol da célula alvo. A fusão e a endocitose são realizadas apenas por exossomos, mas as MVs derivadas da membrana plasmática podem ter destinos semelhantes.

Há diferentes tipos de interação das VEs com as células-alvo (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Em alguns casos, esta interação é restringida a superfície celular através da ligação ao receptor. Outro caso envolvido com a ligação a receptores é seguida por fusão da vesícula com a membrana plasmática da célula alvo; ou inclusive a captação endocítica da vesícula. Neste último caso, as VEs podem permanecer dentro de endossomos e serem direcionadas para um lisossomo ou pode ocorrer à fusão da membrana da VE com a membrana do endossomo, com a consequente descarga do conteúdo para o citoplasma (transferência horizontal); ou as VEs podem ser devolvidas para o espaço extracelular após a fusão da membrana do endossomo contendo VEs com a membrana plasmática (transcitose)(TORRECILHAS *et al.*, 2012).

Desta forma, a interação de VEs com células-alvo permite a transferência intercelular de componentes de membrana. Além de moléculas de superfície e proteínas citoplasmáticas, os mRNAs e miRNAs podem ser direcionados para as células-alvo. Esta transferência de material pode representar um mecanismo de transferência genética, permitindo que diferentes tipos celulares influenciem no fenótipo de outras células através da liberação de VEs(COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014; TORRECILHAS *et al.*, 2012).

A interação das VEs liberadas por células secretoras com as células - alvo é específica, é necessário que haja reconhecimento através de receptores específicos e não de forma aleatória, com qualquer célula após um contato qualquer sem reconhecimento. Por exemplo, as vesículas liberadas por plaquetas interagem com macrófagos e células do endotélio, mas não com neutrófilos(COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI, 2009). Esta especificidade parece está determinada por moléculas de adesão presentes na superfície das VEs.

A descoberta que vesículas extracelulares participam em mecanismos de comunicação intercelular à distância (VALADI *et al.*, 2007) levou a um interesse renovado sobre esta classe de estruturas e os estudos mostraram

que estas estruturas podem atuar em processos neoplásicos e distúrbios trombóticos, imunológicos e hematológicos (MENCK *et al.*, 2017).

Além da comunicação interna, VEs vem sendo particularmente importante no processo de interação parasito-hospedeiro em protozoários, associadas como fator de virulência em mecanismos invasivos de diversos parasitas, como *Plasmodium falciparum* (MANTEL; MARTI, 2014a), *Trypanosoma cruzi* (CAMPOS *et al.*, 2015), *Leishmania sp* (ATAYDE *et al.*, 2015), *Trichomonas vaginalis* (TWU *et al.*, 2013)(Tabela 1).

Tabela 1: Função das vesículas extracelulares em diferentes parasitos humanos

Protozoário	Função das VEs	Referências
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Aumento da adesão de parasitas.	(TWU <i>et al.</i> , 2013)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Aumento da penetração em células hospedeiras	(TORRECILHAS <i>et al.</i> , 2009)
<i>Plasmodium falciparum</i>	Transferência de fatores de resistência a drogas e envolvimento na diferenciação sexual	(MANTEL; MARTI, 2014a)
<i>Toxoplasma gondii</i>	Estimulação de resposta pró-inflamatória	(BHATNAGAR <i>et al.</i> , 2007)
<i>Leishmania</i>	Modulação da resposta imune	(SILVERMAN; REINER, 2011)
<i>Trypanosoma brucei</i>	Exportação de proteínas	(GEIGER <i>et al.</i> , 2010)
<i>Acanthamoeba stellani</i>	Carreia lipases, proteases e glicosidases sem significado biológico bem elucidado.	(GONÇALVES <i>et al.</i> , 2019)

A patogênese das infecções por *Acanthamoeba* é dependente de diversos fatores já citados como a produção de substâncias citopáticas como enzimas proteolíticas, glicoproteínas com manose e resíduos de N-acetilglucosamina

que levam à lesão do hospedeiro (ALIZADEH *et al.*, 2008; SIDDIQUI; KHAN, 2012). A produção dessas substâncias parece estar associada a características intrínsecas da linhagem, sendo possível identificar proteases específicas expressas em cepas consideradas patogênicas e não observadas nas não patogênicas (KHAN *et al.*, 2006). Outro aspecto importante é a produção do efeito citotóxico causado sem a necessidade do contato direto com o tecido. Esta ação a distância pode ser mediada por meio de estruturas membranares ou endocíticas, sendo liberadas pelo protozoário isoladas ou compartimentadas em vesículas, assim como visto em outros parasitas. Portanto, estudar e conhecer as propriedades das vesículas extracelulares produzidas pelos trofozoítos de diferentes linhagens pode auxiliar no conhecimento da patogênese desse organismo. (GONÇALVES *et al.*, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar comparativamente VEs produzidas por *Acanthamoeba* de diferentes genótipos quanto a características físicas e funcionais

3.2 Objetivos Específicos:

3.2.1 Obter e purificar VEs de quatro cepas de *Acanthamoeba* de genótipos distintos (T1, T2, T4 e T11) por centrifugação diferencial;

3.2.2. Caracterizar as VEs quanto ao seu tamanho e quantidade produzida pelas diferentes cepas de *Acanthamoeba*;

3.2.3 Avaliar o perfil das proteases de VEs de *Acanthamoeba* e a sua atividade;

3.2.4 Avaliar o potencial pró-inflamatório das VEs em ensaios de produção de óxido nítrico, IL-6 e TNF- α por macrófagos peritoneais de linhagens distintas de camundongos (BALBC, C57BL/6 selvagem e nocautes *Toll-like 2* e *4*).

3.2.5 Avaliar o papel das proteases carregadas pelas VEs na atividade pró-inflamatória em macrófagos murinos.

4. METODOLOGIA

4.1 Cultivo dos Isolados de *Acanthamoeba*

Quatro isolados de genótipos distintos de *Acanthamoeba* foram utilizados, conforme descrito abaixo:

I. **ALX**: isolado obtido de um caso clínico de ceratite amebiana, em 2006, na cidade de Vitória, Espírito Santo, Brasil. O isolamento foi realizado em placas de ágar soja contendo 200µL de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e no mesmo ano a cultura foi axenizada em meio PYG (proteose-peptona extrato de levedo) com 10% de soro bovino fetal. Este isolado apresenta características de maior patogenicidade conforme testes fisiológicos de termo e osmotolerância e apresenta características do grupo morfológico II pertencente ao genótipo T4 (DUARTE *et al.*, 2013).

II. **R2P5**: isolado obtido de poeira doméstica também na cidade de Vitória, Espírito Santo, em meio ágar soja, tem características do grupo morfológico II de Pussard e Pons (1978) e pertence ao genótipo T1, conforme descrito por POSSAMAI (2018). O genótipo T1 tem sido encontrado em casos de encefalite amebiana granulomatosa (SISSONS *et al.*, 2004). Em 2014 o isolado R2P5 foi axenizado em PYG com 10% de soro bovino fetal no Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia – UFMG por tratamento de cistos com antibióticos conforme descrito por ALFIERI (2000) e modificado por DUARTE (2013) (ALFIERI *et al.*, 2000; DUARTE *et al.*, 2013).

III. **AP4**: cepa obtida do American *Type Culture Collection* de código ATCC #30872, que apresenta características de menor patogenicidade, conforme estudo de ROCHA-AZEVEDO & SILVA-FILHO (2007). Em outro estudo, porém, essa cepa induziu encefalite e infecção sistêmica após reisolamentos de modelo animal (VERÍSSIMO *et al.* 2013) indicando que apresenta certo potencial patogênico. É uma cepa de origem ambiental isolada de água (Turkegee, Alabama, Estados Unidos da América) e identificada como genótipo T2 por DUARTE *et al.* (2013) e vem sendo mantida no laboratório em meio PYG com 10% de soro bovino fetal.

IV. **AR15**: isolado obtido de poeira de janela em ambiente doméstico, na cidade de Vitória, Espírito Santo, em meio ágar soja e axenizado em meio PYG

com 10% de soro bovino fetal em 2007. Apresenta características de baixa patogenicidade, conforme testes fisiológicos e foi classificada como pertencente ao genótipo T11 (DUARTE *et al.*, 2013).

As características das amostras estão resumidas na Tabela 2. Para os experimentos, as culturas foram adaptadas a PYG sem soro bovino fetal, contendo antibiótico enrofloxacina (10 µg/mL). Os repiques de manutenção foram realizados em tubos com 5 mL do mesmo meio, à temperatura ambiente, mensalmente.

Tabela 2 Características principais das amostras de *Acanthamoeba* utilizadas no presente estudo:

Isolados	Origem	Isolamento (a)	Axenização ^(b)	Genótipo ^(c)	Osmotolerância (1M)/ termotolerância ^(d)
ALX	Caso de ceratite, Vitória, ES-Brasil Ambiente doméstico	2006	2006	T4	+ / 42°C
R2P5	Vitória, ES-Brasil Água-Turkegee,	2011	2014	T1	- /40° C
AP4	AL-EUA (ATCC30872) Ambiente doméstico	1965	NC	T2	NC
AR15	Vitória, ES-Brasil	2007	2008	T11	- / 37°C

(a) Isolamento realizado em placa de meio semi-sólido (ágar soja) com *Escherichia coli*

(b) Tratamento de cistos com antibióticos e axenização em meio PYG com 10% de soro bovino fetal (DUARTE *et al.*, 2013; POSSAMAI *et al.*, 2018).

(c) Genotipagem por sequenciamento de fragmento do 18S rDNA (DUARTE *et al.*, 2013, POSSAMAI *et al.*, 2018).

(d) Ensaio de patogenicidade em cultivo em meio semi-sólido (ágar soja), com tolerância a 1M e a 40°C/42° C sendo indicativos de maior patogenicidade.

NC: não conhecido

4.2 Condições de vesiculação

Para a realização dos ensaios de vesiculação, as culturas foram repicadas semanalmente em garrafas de cultivo de área 75 cm² com 200mL de meio PYG com antibiótico (enrofloxacina 10µg/mL) e incubadas em estufa a 32° C. Os repiques escalonados foram realizados para obter a concentração aproximada de 10⁷ trofozoítos por mL, após 72h de crescimento (fase exponencial). Os trofozoítos foram transferidos das garrafas para tubos de 15mL, submetidos a duas lavagens em Salina de Page por centrifugação a 400 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. Os trofozoítos foram quantificados em Câmara de Neubauer, usando Trypan blue 0,4 % para exclusão de formas inviáveis e então submetidos a uma lavagem adicional por centrifugação, realizada em meio de RPMI - 1640, livre de soro bovino fetal, preparado com água ultrapura e filtrado em membrana de 0,22 µm. O sedimento foi suspenso em meio RPMI e uma quantidade contendo 1 x 10⁷ trofozoítos foi transferida para 20 mL desse mesmo meio, em tubos cônicos graduados de 50 mL resultando em uma concentração final de 5 x 10⁵ trofozoítos/mL. Os tubos foram incubados em estufa a 37° C para a vesiculação, por 2 horas sob agitação de 180 rpm. Após esse período, uma alíquota de 100 µL do material foi retirada para avaliação da viabilidade celular, em câmara de Neubauer utilizando Trypan blue 0,4%.

4.3 Isolamento das vesículas extracelulares

As culturas vesiculadas foram submetidas à centrifugação diferencial para separação das vesículas extracelulares, conforme a seguir:

1. Os 20 mL da cultura foram centrifugados a 700 x g durante 10 min, a 20° C para sedimentação dos trofozoítos. O sobrenadante contendo as vesículas extracelulares foi transferido a um novo tubo.
2. O sobrenadante foi centrifugado a 2000 x g durante 10 min a 20° C para sedimentação de detritos celulares.
3. O sobrenadante contendo as VEs foi recuperado e filtrado em filtro 0,22 µm (Millipore®). O filtrado foi submetido à ultracentrifugação a 100.000 x g durante 120 min a 4°C, em ultracentrífuga Beckman Coulter, Inc. O

sobrenadante foi descartado e as VEs foram suspensas em 100 uL de meio RPMI - 1640 pH 7,2 (previamente filtrado com membrana de 0,22 µm, Millipore®). Essas amostras foram armazenadas a -80°C.

4.4 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

As amostras purificadas após a ultracentrifugação foram quantificadas e avaliadas por Análise de rastreamento de nanopartículas (Nanotracking Particle Analysis- NTA), utilizando o equipamento Nanosight LM10. O sistema NanoSight LM10 (NanoSight Ltd. Amesbury, Reino Unido) utiliza uma tecnologia baseada no espalhamento dinâmico de luz e no movimento Browniano para obter distribuição de tamanho e concentração das partículas em suspensão. As partículas no fluido são iluminadas por um feixe de laser (532 nm) finamente focado através de um prisma de vidro. As partículas foram visualizadas utilizando um microscópio óptico convencional, com aumento de 20x equipado com uma câmera de vídeo com sensor de imagem tipo SCMOS (scientific complementary metal-oxide semiconductor).

Para as análises, as amostras foram diluídas 10 vezes em PBS, previamente autoclavado e filtrado em membrana de 0,22 µm (Millipore®). Para cada amostra, foram feitas leituras em triplicata de vídeos de 60 segundos de duração com 25 quadros por segundo (25 FPS) e temperatura fixa de 25 °C. Os parâmetros Blur e Max Jump Distance permaneceram configurados na opção automática, o parâmetro nível da câmara variou entre 9 e 10 e o limite de detecção foi configurado em 3 para todas as leituras. Como controles negativos, foram usadas as amostras de meio submetidas ao processo de vesiculação, sem trofozoítos. As análises foram realizadas com o programa NTA (versão 3.0).

4.5 Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica foi utilizada para identificar e confirmar por imagem a produção de vesículas pelos isolados. Trofozoítos de *Acanthamoeba* em garrafas de cultivo, incubados a 32° C, foram preparados e

transferidos para meio de vesiculação (RPMI), conforme item anterior 3.2. A vesiculação foi realizada a 37° C sob agitação por uma hora. Os trofozoítos foram concentrados por centrifugação (400g a 4°C) e suspensos em meio RPMI fresco, com menor volume para obter a concentração de 1×10^7 trofozoítos por mL.

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram fixadas durante 60 minutos em temperatura ambiente, com 2,5% de glutaraldeído em tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,2), contendo sacarose 0,146 M e CaCl_2 5 mM. Após a fixação, as amostras foram transferidas e pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio, desidratado em gradiente de etanol, seguida por gradiente de acetona (25 mM) e incorporado em resina Epon, corados por acetato de uranila. As amostras foram fotografadas em microscópio eletrônico JEOL JSM-5600 e documentadas.

Para a microscopia eletrônica de transmissão (MET), o sedimento resultante do processo de vesiculação foi suspenso em tampão de fosfato 0,1M com 2,5% Glutaraldeído em formaldeído para a fixação primária. A amostra foi incluída em agarose a 4% em uranila para proteção aos processos envolvendo os reagentes químicos. A fixação secundária foi realizada com 2% de tetróxido de ósmio (OsO_4) e mantida por uma hora em temperatura ambiente. Após a fixação secundária, foram realizadas sucessivas lavagens com água ultrapura para retirada do tetróxido de ósmio por centrifugação a 400 g por 2 minutos em temperatura ambiente e consecutivos banhos de desidratação em gradiente de acetona e etanol (30,50,70 e 100%) para a inclusão da amostra em uma resina de epon miscível em acetona que permaneceu polimerizando por 24 horas. A resina já polimerizada passou por uma triagem em um ultramicrotomo realizando cortes semifinos utilizando bisturi de diamantes de 1 μm em lâminas sob a água, ressecados em chapa de platina aquecida a 100°C, corados com azul de toluidina a 4% e visualizados em microscópio óptico convencional para visualização dos trofozoítos de *Acanthamoeba*. Após a confirmação da morfologia celular intacta, as amostras incluídas na resina novamente foram cortadas com cortes semifinos com lâminas de 50 a 70 μm . As fatias cortadas foram coletadas com uma grade de

cobre coberta com carbono, contrastadas com citrato de chumbo e visualizadas diretamente no microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12-SpiritBiotwin FEI – 120 Kv, do Centro de Microscopia da UFMG.

4.6 Atividade de proteases nas VEs de *Acanthamoeba*

Com o intuito de avaliar se as VEs secretadas por *Acanthamoeba* apresentam atividade de proteases, foi realizado o Ensaio de Zimografia, com base nos procedimentos de CARVALHO *et al.* (2011), com algumas modificações. Amostras de 25 µg das vesículas extracelulares produzidas e purificadas foram utilizadas para cada isolado, em quatro alíquotas para cada um, sendo uma correspondente ao extrato original e as outras três previamente incubadas com um inibidor de proteases por 30 minutos a temperatura ambiente. Os inibidores utilizados foram fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) na concentração de 1 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 50 mM e E64 a 10 mM, inibidores de serino, metalo e cisteína proteases, respectivamente. As amostras foram diluídas em tampão de amostra não redutor 6X (BIORAD®) e analisados por SDS PAGE co-polimerizado com 100 mg/mL de gelatina. A corrida foi realizada em tampão PH 7,4 a 80 V para a largada do gel de compactação e a 100 V para a corrida no gel de fracionamento. Após a separação das proteínas, o gel foi incubado em 2,5% de solução de Triton X-100 por 60 minutos para hidratação, sendo em seguida transferido para os tampões de desenvolvimento para a atividade proteolítica, sendo um tampão de pH neutro (50 mM de Tris-HCl, pH 7.4, contendo 10 mM de CaCl₂) e um tampão ácido (acetato de sódio, pH 3,5) na temperatura de 37°C por 48 horas. Após esse período, o gel foi incubado em Coomassie Brilliant Blue para coloração por três horas e em seguida, foi descorado por três vezes sequenciais (tempos de 15, 30 e 60 minutos) em solução descorante de metanol (30%) e ácido acético (10%) para a visualização das bandas claras correspondentes às áreas de digestão pelas proteases.

4.7 Indução de marcadores inflamatórios por VEs de *Acanthamoeba*

4.7.1 Animais

Os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos BALB/c, C57BL/6 selvagem e seus respectivos knockout para receptores *Toll*, sendo C57BL/6 TLR2^{-/-} e C57BL/6 TLR4^{-/-}. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto René Rachou-Fiocruz Minas e manuseados de acordo com as boas práticas em experimentação animal. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob o número de protocolo P-17/14-2.

4.7.2 Preparo dos macrófagos

Os animais foram submetidos à aplicação intraperitoneal de tioglicolato de sódio a 2% e após 72 horas, foram sedados, anestesiados, abertos delicadamente sem ferir o peritônio. Os macrófagos intraperitoneais foram recuperados por suspensão em meio RPMI – 1640 sem soro bovino fetal, seguido de três lavagens com solução de PBS estéril a 4°C em 400xg por 10 minutos. Após o procedimento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os macrófagos obtidos foram suspensos em RPMI acrescido a 10% com soro bovino fetal, quantificados e um total de 1×10^5 células foram plaqueadas individualmente em poços de 200 μ L. Após a incubação em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 5 horas, o sobrenadante da cultura celular foi removido para a retirada de células não aderentes. Por fim, interferon gama (INF γ) na concentração de 3U/mL foi adicionado às culturas, que foram incubadas novamente por 18 horas nas mesmas condições anteriores.

4.7.3 Estimulação dos macrófagos

Os macrófagos primados com INF γ foram estimulados com 5×10^8 vesículas/mL (10^8 por poço). Como controles positivos, foram incluídos o lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (100 ng/mL) e extrato de

Staphylococcus aureus (100 ng/mL). O meio RPMI com IFN- γ (3U/mL) foi utilizado como controle negativo. Paralelamente, foi realizada a estimulação com extrato celular de trofozoítos para avaliar a viabilidade dos macrófagos, conforme procedimentos detalhados posteriormente no item 3.7.6. Os lisados foram preparados com trofozoítos em tampão RIPA (1x PBS, 1% Nonidet P-40, 0.5% desoxicolato de sódio, 0.1% SDS) acrescido de inibidores de proteases e fosfatases (PMSF 0,1%, Aprotinina 50 KIU/ml e 100 mM ortovanadato de sódio). Cada poço recebeu 10 μ L de lisado, correspondente a 10^6 trofozoítos, resultando numa proporção de 10 amebas para um macrófago. A placa foi incubada por 48 horas a 37° C, em estufa a 5% de CO₂.

Ao final do período de incubação, a placa foi centrifugada a 700g X por 10 minutos e a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para dosagem de óxido nítrico e de citocinas.

4.7.4 Dosagem de óxido nítrico

A realização da curva da Griess e dosagem de óxido nítrico foi realizada conforme descrita pelo fabricante (kit Griess Reagent System, Promega). Resumidamente, 50 μ L da solução de sulfalidamida (1% de sulfalidamida em 5% de ácido fosfórico) foram adicionados ao sobrenadante e mantidos por 10 minutos a temperatura ambiente protegida da luz. O reagente NED (cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina) foi adicionado às amostras e a concentração de nitrito produzida pelos macrófagos foi comparada aos níveis detectados em filtro de 540 nm em leitor de placas com os obtidos em curva padrão de concentrações conhecidas de nitrato de sódio NaNO₃ fornecidos pelo kit. Essa metodologia permite quantificar os níveis de NO através do nitrito (NO₂) que reage com a sulfanilamida para produzir o íon diazonido. Os nitrogênios (diázo compostos) reagem com o reagente NED, formando um cromóforo de coloração rosa que apresenta boa leitura em picos de absorvância de 540 nm (BRYAN; GRISHAM, 2007). Esse ensaio foi realizado em todas as linhagens de macrófagos conforme descrito na **Figura 9**.

4.7.5 Dosagem de IL-6 e TNF- α

Uma outra fração do sobrenadante foi utilizada para dosagem da citocina pró-inflamatória IL-6 e TNF- α utilizando o método de Cytometric Bead Array - CBA (BD, Pharmingen, EUA) que se baseia no uso de esferas de poliestireno marcadas com diferentes graus de fluorescência, recobertas com anticorpos específicos, que são detectados nos canais FL3 ou FL4. Esse sistema permite uma análise quantitativa das citocinas marcadas com ficoeritrina - PE. Resumidamente, 50 μ L do sobrenadante da amostra foram misturados a 50 μ L de duas populações distintas de *beads* com distintas intensidades de fluorescência conjugadas a anticorpos de captura específicos anti-citocinas IL-6 e TNF- α (Cytokine Kit, BD, Pharmingen, EUA; Catalog. n. 560484) e em seguida foi adicionado 50 μ L do reagente de detecção das citocinas. Em seguida, 18 μ L do coquetel de anticorpos foram conjugados com ficoeritrina – PE e incubados por 3 horas, à temperatura ambiente sob abrigo de luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com PBS e centrifugadas a 340 g, por 7 minutos e o sobrenadante foi descartado. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software CellQuest (BD). Esse ensaio foi realizado em nas linhagens de camundongo Balb C e C57BL / 6 selvagem conforme descrito na **Figura 9**.

4.7.6 Viabilidade dos macrófagos estimulados por VEs e lisado celular

Para avaliar a viabilidade dos macrófagos após a estimulação com VEs e com lisado de trofozoítos, foi utilizado o teste de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}, que é um ensaio colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan {E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia

respiratória.

Após a retirada de todo o sobrenadante, os macrófagos aderidos aos poços da placa foram lavados duas vezes com 200 μ L de PBS estéril a temperatura de 4°C e posteriormente foi adicionado 100 μ L da solução de MTT a 0,5mg/mL. A placa foi incubada por 2 horas em estufa a 37° C com 5% de CO₂. A solução de MTT foi retirada e em seguida, 100 μ L de DMSO puro foi adicionado a cada poço. A placa foi agitada por 5 minutos e depois foi deixada em repouso por mais 5 minutos para estabilização da cor. A leitura foi feita em leitor de ELISA a 540 nm.

4.7.7 Papel das proteases carregadas por VEs na produção de NO

Para avaliar a relação das proteases carregadas pelas VEs com a ação pró-inflamatória, VEs de duas linhagens de maior potencial patogênico que apresentaram melhor desempenho na zimografia (ALX e R2P5) foram utilizadas em um ensaio de produção de NO. Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C foram preparados conforme descrito anteriormente (item 4.7.2) e foram estimulados com VEs (5×10^8 /mL) não tratadas e também submetidas aos seguintes tratamentos prévios: (1) incubação à temperatura ambiente, por 30 minutos, com os inibidores de serinoproteases, metaloproteases e cisteínoproteases (PMSF, EDTA, E64 a 5mM); (2) aquecimento a 100° C por 5 minutos em banho maria. O Lipopolissacarídeo (LPS) e o meio RPMI foram usados como controles adicionais positivo e negativo, respectivamente. A incubação, recuperação do sobrenadante e dosagem de NO foi realizada conforme descrito nos itens 4.7.3 e 4.7.4.

4.8 Análise estatística

As diferenças no tamanho e concentração de VEs foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA para amostras com a distribuição normal e pelo Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos, utilizando o software GraphPad Prism 5.0. O nível de significância foi de 95% ($p < 0.05$).

Os resultados dos ensaios com macrófagos murinos foram avaliados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste post hoc de

Dunn para comparações múltiplas entre grupos (linhas acima das barras). O teste T de Student foi usado para comparar as diferenças de estimulação dos marcadores entre cada amostra de *Acanthamoeba* e as letras acima das barras indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) (NOGUEIRA *et al.*, 2020).

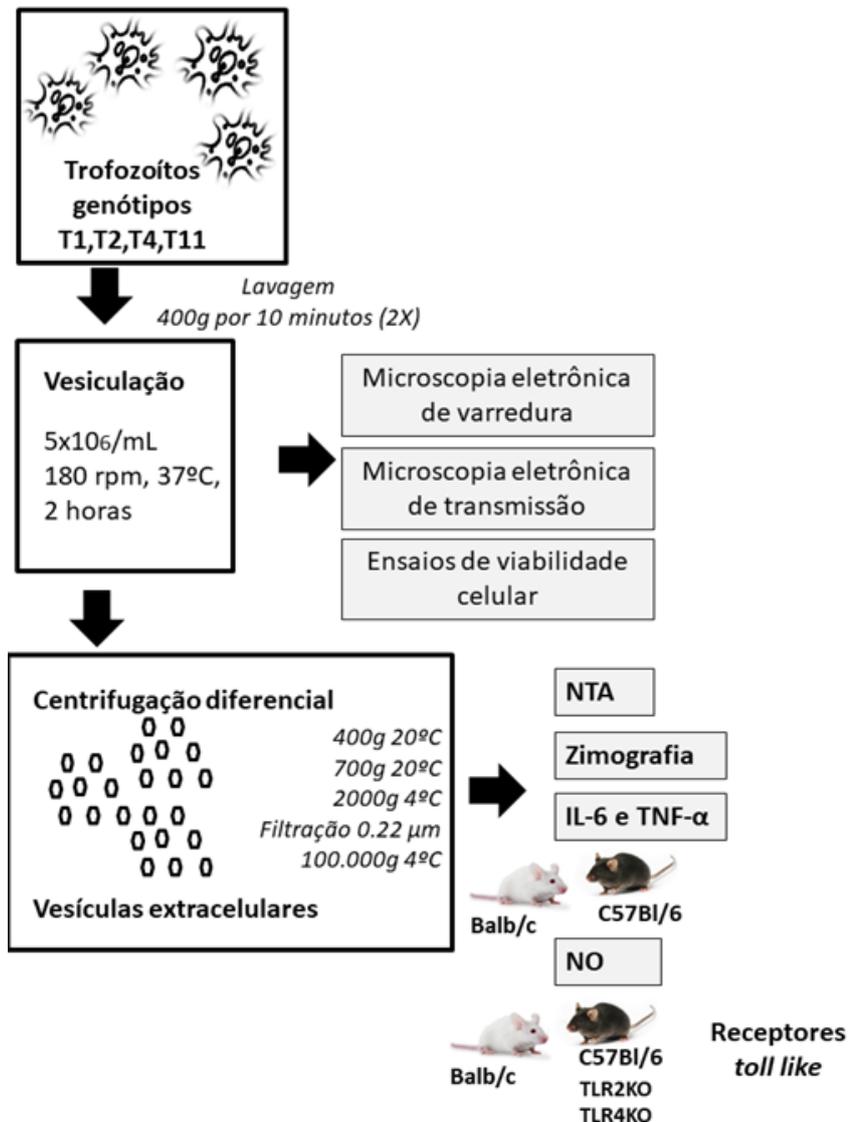


Figura 9: Metodologia resumida e esquematizada. Os quatro genótipos foram preparados conforme descrito detalhadamente nos itens anteriores da metodologia para seus respectivos ensaios em diferentes etapas do isolamento das vesículas. As quatro linhagens de camundongos foram utilizadas para diferentes ensaios com diferentes amostras. As linhagens Balb/C, C57Bl/6, TLR2KO e TLR4KO utilizaram extrato celular e VEs para a dosagem de óxido nítrico. As linhagens selvagens (Balb/C e C57Bl/6) utilizaram as mesmas amostras para avaliar a produção de óxido nítrico, IL-6 e TNF- α , sendo que o selvagem Balb/C utilizou vesículas e inibidores de proteases das cepas de genótipos considerados mais patogênicos (ALX-T4 e R2P5-T1).

5. RESULTADOS

5.1 *Acanthamoeba* produz VEs com características comuns entre os diferentes genótipos

A avaliação por NTA das preparações vesiculares indicou que as diferentes cepas de *Acanthamoeba* produzem VEs com perfil homogêneo, conforme indicado pela ausência de picos secundários (**Figura 10 A-D**), com predominância de tamanhos entre 100 a 200 nm (**Figura 10 E**). Quando avaliadas as replicatas das medições capturadas pelo software (10 para cada amostra), foi observado tamanhos de VEs entre 120 nm a 186 nm e concentrações entre $3,4 \times 10^9$ a $5,1 \times 10^{11}$ partículas/mL (**Figura 10 F-G**). Comparando o tamanho e quantidade de VEs entre as amostras dos diferentes genótipos, não foram observadas diferenças significativas no perfil de produção entre elas ($p=0,2801$).

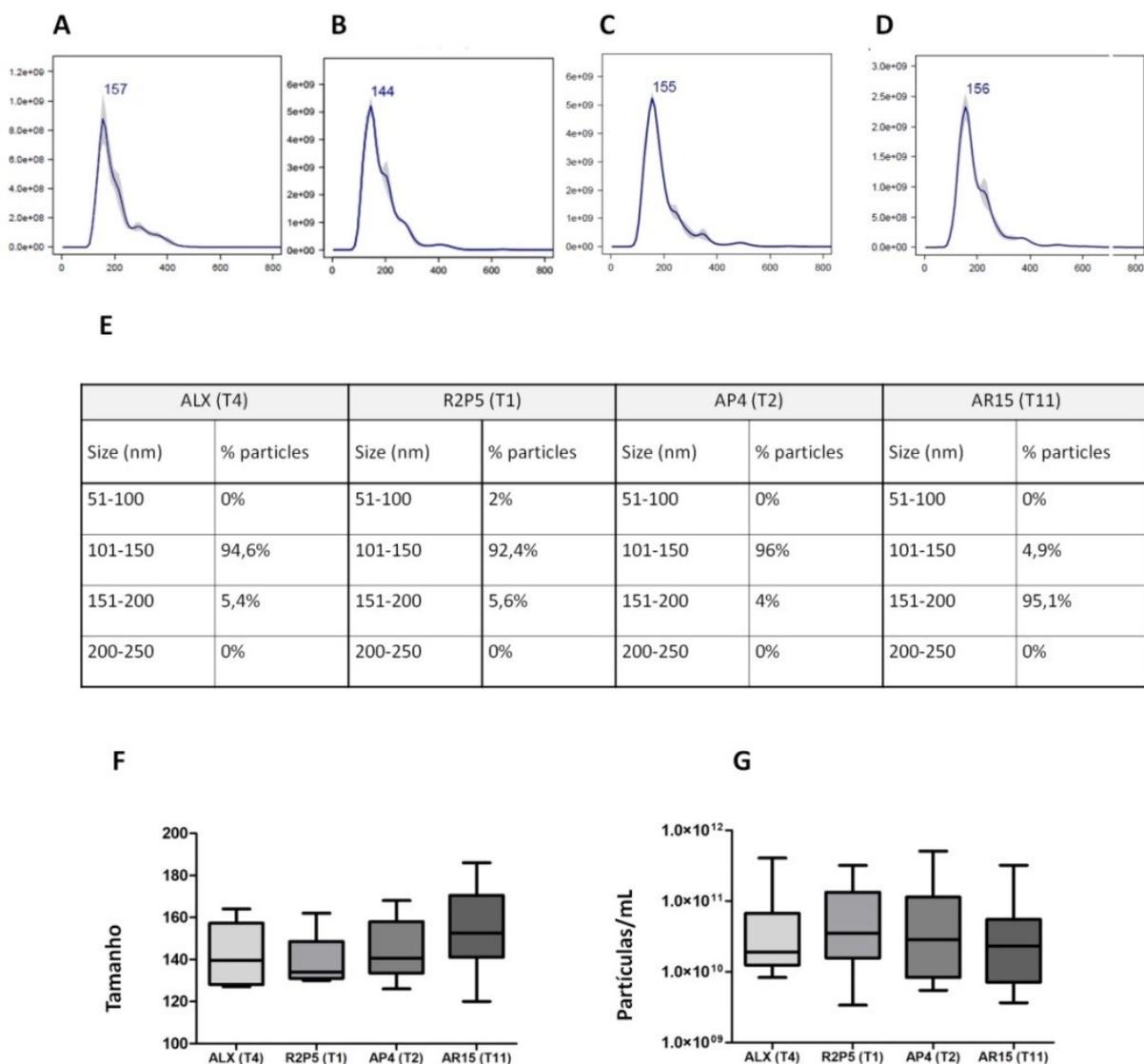


Figura 10: Análise de rastreamento de partículas (NTA) de vesículas extracelulares (VEs) de *Acanthamoeba*. A-D: Gráficos de distribuição gerados por NTA representativo de uma das replicatas de VEs produzidas pelas cepas ALX (genótipo T4), R2P5 (genótipo T1), AP4 (genótipo T2) e AR15 (genótipo T11) de *Acanthamoeba*, respectivamente. **E.** Distribuição dos tamanhos em relação à quantidade de VEs produzidas pelas cepas de *Acanthamoeba* correspondente a replicata representada. **F- G.** Comparação entre replicatas de medições (n=10) de tamanho e quantidade de VEs produzidas pelas cepas de *Acanthamoeba*. Não houve diferença significativa entre as diferentes cepas ($p=0,2801$, Teste ANOVA $p<0,05$).

Nas imagens de MEV obtidas, foi possível visualizar a presença de acantopódios numerosos, estruturas típicas desse gênero, nos trofozoítos das quatro amostras (**Figura 11 A, C, E, G**). Os isolados ALX e R2P5 apresentaram aparentemente maior número de acantopódios.

Além disso, a MEV permitiu visualizar claramente estruturas vesiculares compatíveis com VEs na superfície dos trofozoítos (**Figura 11 A-H**). Em relação à MET, foi possível visualizar o citoplasma granuloso contendo materiais ribossômicos distribuídos em algumas imagens e a presença de mitocôndrias (**Figura 12 A-H**). Estruturas compatíveis com VEs foram visualizadas tanto no citoplasma (**Figura 12 A, B**) quanto sendo exteriorizadas na superfície celular (**Figura 12 D**), apresentando aspecto característico de bicamada lipídica.

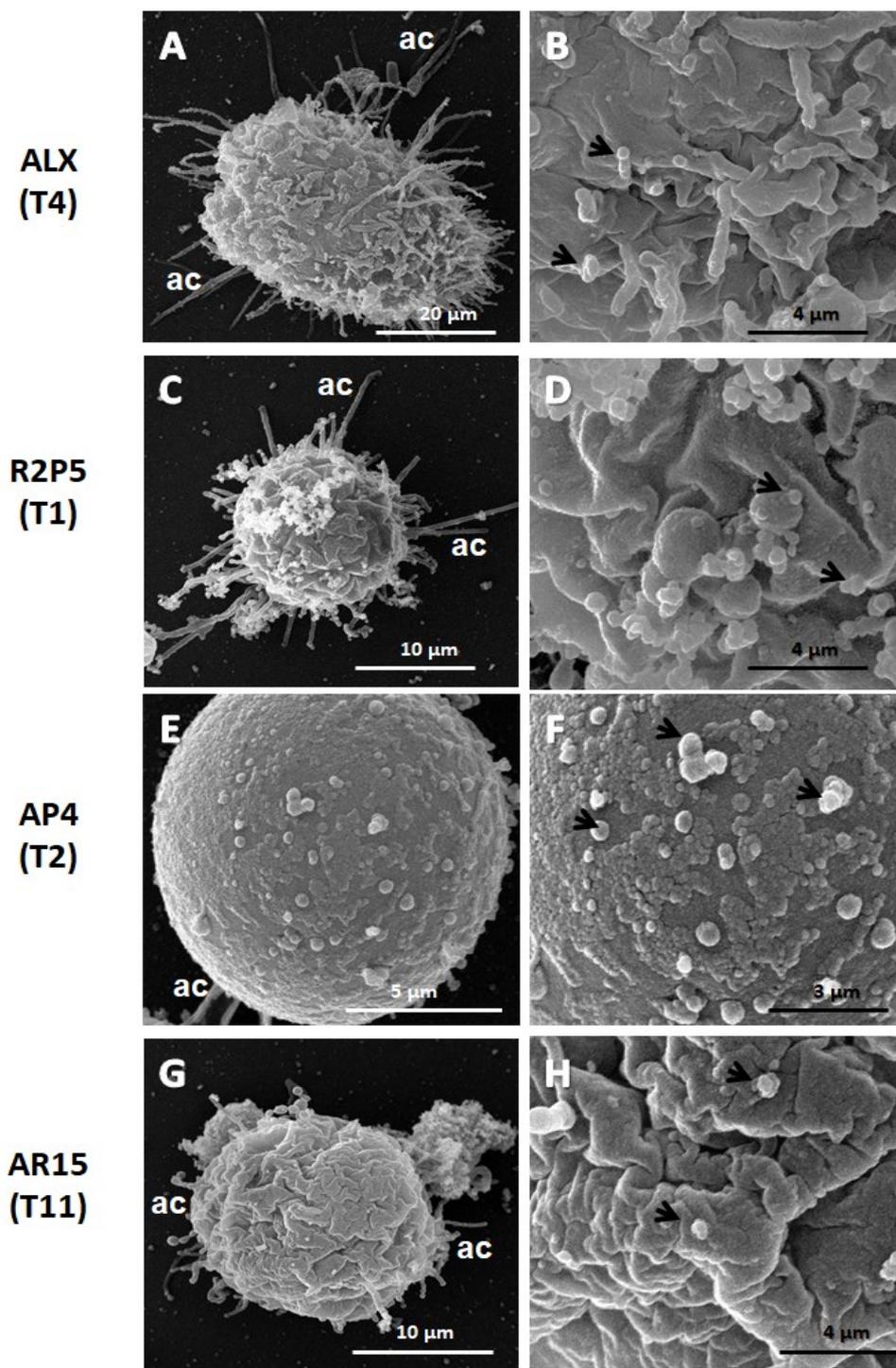


Figura 11:Microscopia eletrônica de varredura de trofozoítos de *Acanthamoeba* em processo de vesiculação. As imagens foram capturadas durante o processo de vesiculação pelos trofozoítos de diferentes genótipos e origens de *Acanthamoeba* ALX-T4 (A-B), R2P5 –T1 (C-D), AP4-T2(E-F),AR15-T11(G-H). A fileira da esquerda (A,C,E e G) apresenta as células emitindo os acantopódios (setas brancas) que são estruturas típicas do gênero e a fileira da direita, em maior tamanho, indica a presença de estruturas compatíveis com VEs na superfície dos trofozoítos indicadas pelas setas pretas (B,D,F,e H).

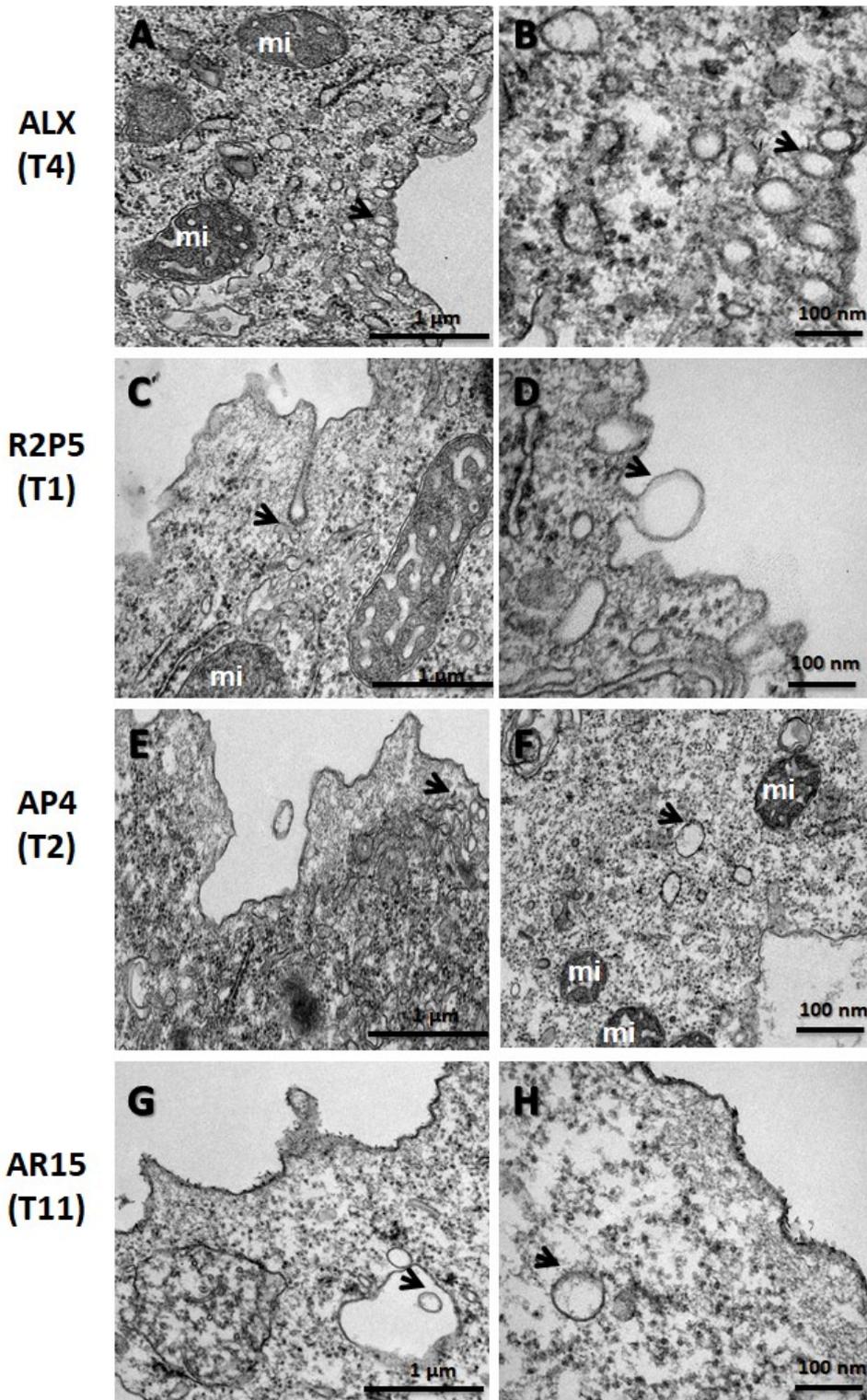


Figura 12: Microscopias eletrônicas de transmissão de trofozoítos de *Acanthamoeba* em vesiculação. Cepas ALX, genótipo T4 (A-B), R2P5, genótipo T1 (C-D), AP4, genótipo T2 (E-F) e AR15, genótipo T11 (G-H). A fileira da esquerda (A,C,E,e G) indica, em tamanho menor, a presença de VEs no interior das células, citoplasma rico em material ribossômico, mitocôndrias (mi), na fileira da direita (B,D,F e G) indicam a presença de VEs próximas as membranas celulares.

5.2 As VEs carregam proteases predominantemente classificadas como serinoproteases

As amostras de VEs purificadas foram avaliadas quanto à presença de proteases, que são consideradas fatores envolvidos na patogênese de *Acanthamoeba*. Em tampões de pH ácido e neutro, foi possível visualizar áreas de degradação da gelatina, devido a atividade de proteases.

O ensaio de zimografia indicou que as VEs de todas as cepas testadas exibiram atividade em pH 7,4, com padrão de bandas idêntico de 100, 59 e 47 kDa (**Figura 13, painel superior**). Entretanto, a atividade mais intensa foi observada nas amostras correspondentes às cepas ALX e R2P5 (genótipos T4 e T1, respectivamente). Em meio ácido (pH 3,5), essas duas cepas exibiram bandas mais evidentes de 100 e 59 kDa, enquanto uma atividade muito fraca de banda de 100 kDa foi detectada em amostras correspondentes às cepas AP4 (T2) e AR15 (T11) (**Figura 13, painel inferior**).

A atividade das proteases foi totalmente anulada pelo inibidor da serinoprotease (PMSF) em ambos os pHs (**Figura 3, painéis inferior e superior do PMSF**). O inibidor de metaloproteases (EDTA) e cisteína protease (E64) diminuíram a intensidade do sinal nas bandas das cepas T4(ALX) e T1(R2P5), em comparação com controles não tratados em ambos os pHs (**Figura 13, EDTA e E64 painéis inferior e superior**). Além disso, uma diminuição da atividade da protease de 47 kDa por esses inibidores foi observado em VEs de todas as cepas em pH 7,4 (**Figura 13, EDTA e E64, painéis superiores**). Estes inibidores não afetaram substancialmente o perfil de proteases das cepas T4 (ALX) e T1(R2P5) em pH 3,5, no entanto, uma banda de 100 kDa tornou-se evidente nas amostras de VEs T2 e T11 (100 kDa)(**Figura 13, EDTA e E64, painéis inferiores**).

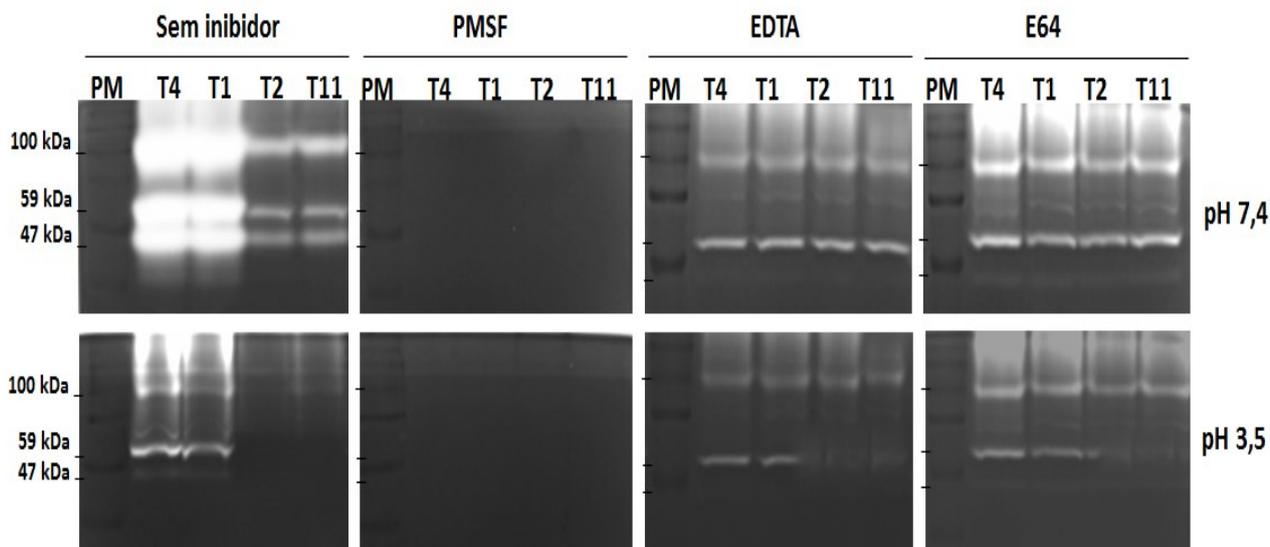


Figura 13: Zimografia das VEs de cepas de *Acanthamoeba*. Amostras de VEs aplicadas em gel de poliacrilamida 10% copolimerizada com gelatina a 10mg/mL. Amostras aplicadas sem inibidores de protease estão na primeira coluna à esquerda e na sequência, as amostras foram tratadas por 30 minutos antes da aplicação, com PMSF (5 mM), EDTA (50 mM) e E64 (10 mM), respectivamente. Na fileira superior, a reação de digestão foi realizada em tampão de TRIS-HCL/CaCl₂ pH 7,4. Na inferior, foi utilizado tampão de acetato de sódio pH 3,5. Cada cepa foi designada por seu genótipo (T4=ALX, T1=R2P5, T2=AP4 e T11=AR15). PM representa marcador de massa molecular e as marcações com traços na borda dos géis a massa estimada das bandas principais (100kDa, 75kDa, 59 kDa e 47kDa de cima para baixo em todos os géis).

5.3 As VEs das cepas patogênicas e não patogênicas apresentaram diferentes níveis de ativação pró-inflamatória em macrófagos murinos

Na avaliação funcional das VEs em relação à ativação de macrófagos peritoneais murinos, um perfil de ativação semelhante foi observado em macrófagos BALB / C e C57BL / 6, na qual a cepa AR15 (T11) induziu uma maior produção de NO do que as outras cepas (**Figura 14**). Em camundongos C57BL / 6 e C57BL / knockout TLR2 (- / -) e TLR4 (- / -), todas as VEs foram capazes de induzir níveis variáveis de NO via TLR4 e secundariamente via TLR2 (**Figura 14**). Como esperado, o LPS (controle TLR4) e extrato de *S. aureus* (controle TLR2) induziram níveis mais elevados de NO via macrófagos TLR2 (- / -) e TLR4 (- / -), respectivamente. Considerando que VEs de *Acanthamoeba* induziram NO via TLR4 / TLR2, os mesmos sobrenadantes

resultantes desse ensaio foram submetidos ao ensaio para a produção de TNF- α e IL-6 apenas em camundongos selvagens (BALB / C e C57BL / 6). Assim como visualizado no ensaio da reação de Griess para dosagem de NO, uma maior produção de TNF- α e IL-6 foi detectado para a cepa AR15 em comparação com ALX, R2P5 e AP4(Figuras 15).

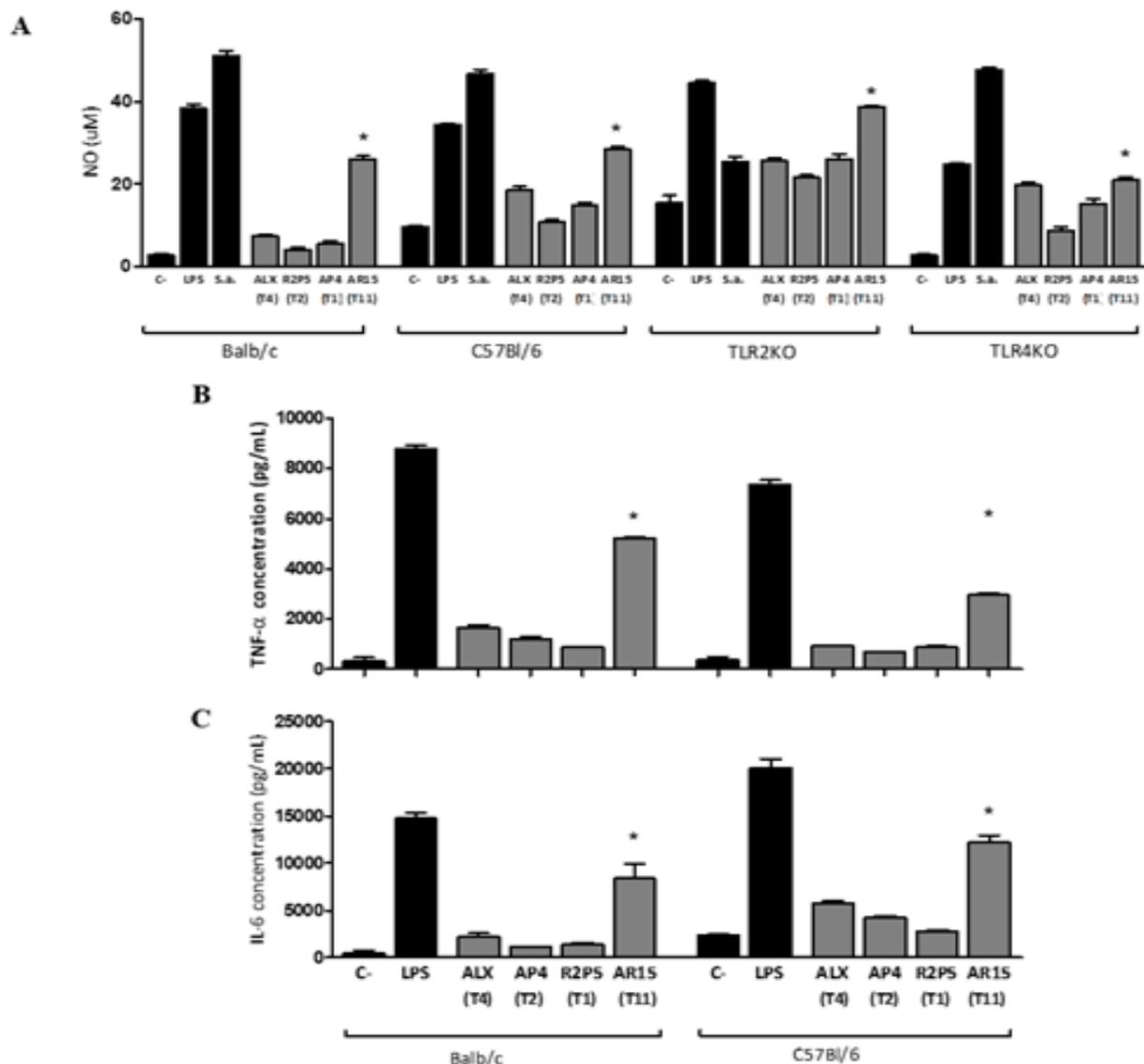


Figura 14: Produção de óxido nítrico (NO) (A), TNF- α (B) e IL-6 (C) por macrófagos peritoneais primados com INF γ e estimulados com VEs de *Acanthamoeba*. Cepas ALX, R2P5, AP4 e AR15, pertencentes aos genótipos T4, T1, T2 e T11, respectivamente. Sobrenadantes coletados após 48 h de interação de VEs com macrófagos BALB-c e C57BL / 6 selvagem e C57BL / 6nocautes (TRL2KO e TRL4KO). A concentração de NO foi medida pela reação de Griess. TNF- α e IL-6 foram determinados por análise de CBA-flex. LPS e *Staphylococcus aureus* (S. a.): controles TLR4 e TLR2, respectivamente. C: meio RPMI com INF γ . Diferença significativa ($p < 0,05$) indicada por asteriscos.

No experimento adicional para avaliar a viabilidade dos macrófagos durante os ensaios de estimulação, foram observados valores acima de 100% quando utilizadas as VEs e abaixo de 50% quando utilizado o extrato total de trofozoítos (**Figura 15**). Não houve diferença significativa quando comparadas as diferentes cepas entre si, em cada grupo (VEs e extrato total).

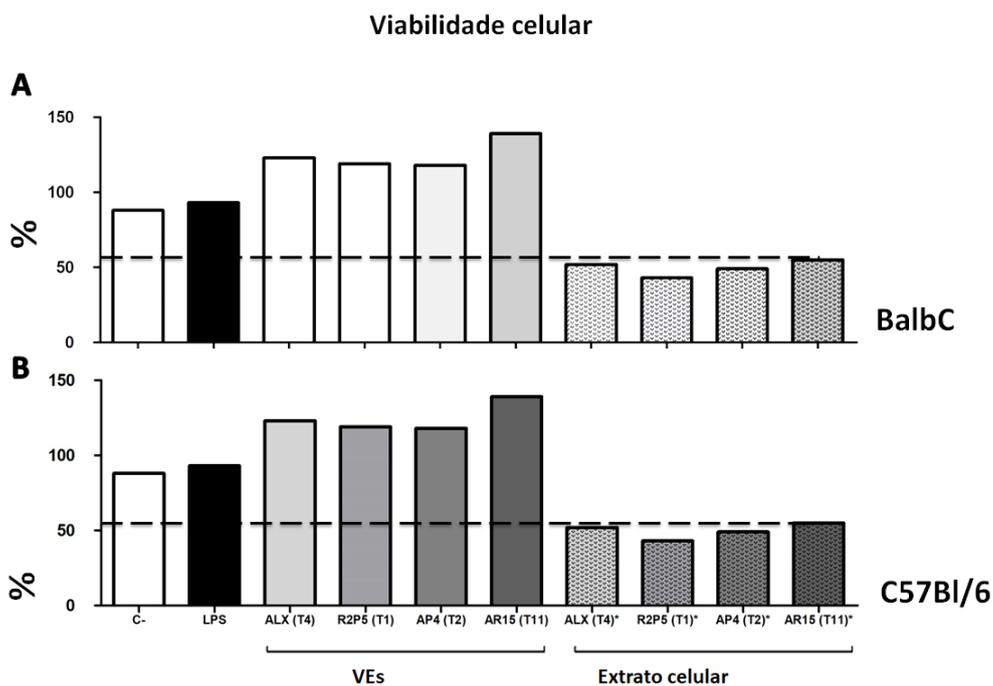


Figura 15: Viabilidade celular dos macrófagos das linhagens BalbC (A) e C57Bl/6 (B) durante estimulação com VEs. As amostras de macrófagos estimulados com VEs apresentaram uma atividade mitocondrial superior a 100% enquanto os macrófagos em contato com os extratos celulares das quatro cepas de *Acanthamoeba* apresentaram uma viabilidade menor ou igual a 50%.

5.4. A produção de Óxido Nítrico pelas VEs das cepas consideradas patogênicas depende da integridade das proteases

Comparando com a estimulação por VEs íntegras, a produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foi significativamente menor quando esses foram expostos a VEs submetidas ao aquecimento ou pré-tratadas com inibidores de proteases (**Figura 16**). A diminuição de

estimulação foi mais evidente nas amostras pré-incubadas com PMSF (inibidor de serinoprotease) para a cepa ALX e PMSF e EDTA (inibidor de metaloprotease) para a cepa R2P5.

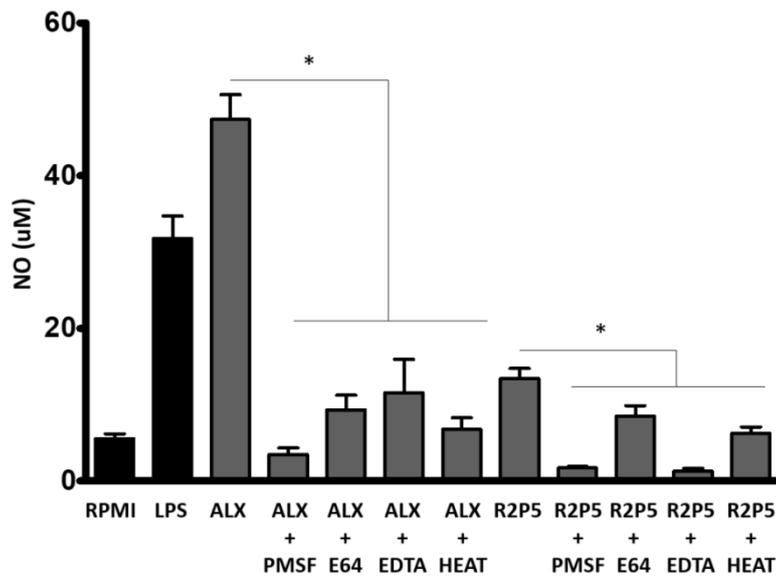


Figura 16: Produção de NO por *Acanthamoeba* VEs aquecidas e pré-incubadas a diferentes inibidores de proteases. VEs foram submetidos ao aquecimento e aos inibidores de proteases antes da exposição aos macrófagos. Os sobrenadantes foram coletados após 48 h de interação EVs com macrófagos de C57BL / 6. A concentração de nitrito foi medida pela reação de Griess. LPS (controle positivo) e RPMI (controle negativo) foram usados. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado que protozoários patogênicos produzem e liberam VEs e que essas estruturas podem atuar de forma crucial nos mecanismos de invasão e imunomodulação do hospedeiro (TORRECILHAS *et al.*, 2012, TWU *et al.*, 2013, MANTEL & MARTI., 2014, SOARES *et al.*, 2017). Mais recentemente, a produção de VEs por trofozoítos de *Acanthamoeba* foi demonstrada, indicando o possível envolvimento na patogênese das infecções por mecanismos independentes de contato, como a ação citotóxica em células de cultivo (GONÇALVES *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2019; RETANA-MOREIRA *et al.*, 2020). Um ponto em comum nesses trabalhos sobre VEs de *Acanthamoeba* foi à avaliação de uma única cepa, em que foram estudados aspectos estruturais e funcionais.

No presente estudo, foi proposta uma abordagem ampla e comparativa de VEs de *Acanthamoeba*, envolvendo quatro cepas diferentes. Com isso, pretendeu-se avaliar se VEs de *Acanthamoeba* apresentariam características funcionais diferentes, que poderiam refletir a diversidade dentro do gênero, conhecido por apresentar linhagens genotipicamente distintas e com maior ou menor propensão a causar infecção (MACIVER *et al.*, 2013, outros).

Como etapa inicial, foi realizado o procedimento de vesiculação, que utilizou trofozoítos em fase exponencial de crescimento. Nessa etapa, o controle e o acompanhamento dos níveis de viabilidade são importantes, uma vez que células que estão em processo de morte celular programada, ou apoptose, liberam os corpos apoptóticos, que são estruturas vesiculares que surgem em resposta às condições de estresse metabólico e apresentam composição específica e distinta das demais classes vesiculares (exossomos e microvesículas) (RAPOSO; STOOORVOGEL, 2013). Nesse trabalho, a viabilidade de todas as culturas foi avaliada no início e ao final do processo, sendo superior a 93%, sendo a maior parte das amostras acima de 95%, indicando assim que as preparações vesiculares obtidas eram preponderantemente compostas por vesículas liberadas por trofozoítos viáveis, que não estivessem em processo apoptótico. Além disso, o processo de filtração em membrana de 0,22 µm, realizado na purificação das VEs, contribui

para a remoção de corpos apoptóticos (1 a 5 μm) e detritos celulares que eventualmente estivessem presentes (RAPOSO; STLOORVOGEL, 2013).

Até hoje, foram descritos inúmeros métodos de isolamento que podem selecionar VEs, dentre eles a ultracentrifugação, diferenças no gradiente de densidade, filtração, fracionamento, cromatografia, enriquecimento, imunoprecipitação e outros kits desenvolvidos com tecnologia de ponta. Porém, cada método de isolamento e análise apresenta seu próprio conjunto de benefícios e desvantagens, e já foram demonstrados que diferentes métodos podem resultar em perfis proteômicos diferentes nas VEs, complicando ainda mais a sua caracterização bioquímica e a identificação de biomarcadores específicos (DOYLE & WANG.,2019). No presente estudo, optou-se por etapas de filtração e centrifugação, que são consideradas válidas para obtenção de VEs de acordo com um consenso entre pesquisadores que são referência na área (THÉRY *et al.*, 2018). Esses autores publicaram em 2018 um documento que determina as informações mínimas para estudos de vesículas extracelulares (Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 - MISEV2018). Nessa publicação, são recomendados os procedimentos para conduzir e relatar trabalhos relacionados às VEs identificando seus respectivos marcadores para aprimorar o rigor e a reprodutibilidade desses estudos.

Estudos anteriores mostraram que os tamanhos dos VEs de *Acanthamoeba* podem variar de 111,3-166,7 nm (GONÇALVES *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2019; RETANA-MOREIRA *et al.*, 2020). Consistente com essas observações, VEs derivados de *Acanthamoeba* no presente trabalho exibiram um perfil homogêneo, com mais de 92% das partículas encontradas na faixa esperada de 100-200 nm (tamanho médio geral de $137,2 \pm 14,7$ nm). Essas dimensões são correspondentes ao esperado tanto para microvesículas (100 nm a 1000nm) quanto para exossomos (30 a 150 nm) (THÉRY *et al.*, 2006). No MISEV 2018 foi determinado que o termo “Vesícula extracelular” deve ser utilizado sempre que não for possível indicar os subtipos microvesículas ou exossomos, que só podem ser adotados se houver outros procedimentos que permitam a identificação e caracterização dessas partículas (THÉRY *et al.*, 2018). Características como a composição proteica, lipídica e a maneira da qual as VEs são formadas e originadas também são usadas para a

classificação. No entanto, é importante considerar que para *Acanthamoeba*, os estudos sobre VEs ainda estão iniciando e não existem até o momento, marcadores que permitam realizar a identificação de possíveis marcadores. Futuramente, com o maior conhecimento sobre VEs de *Acanthamoeba*, há a possibilidade de aplicação em diagnóstico ou tratamento. Em outras áreas o uso de VEs para identificação de doenças já é uma realidade. Um exemplo é o estudo de células tumorais pancreáticas que liberam exossomos que apresentam as moléculas glypican-1 e CD63. Esses biomarcadores são a base de uma tecnologia diagnóstica de biopsia líquida na etapa inicial do câncer que permite a identificação dos exossomos por imunofluorescência em um chip (LEWIS *et al.*, 2018). Em protozoários, um estudo demonstrou a presença de vesículas extracelulares no plasma de pacientes com malária como potencial biomarcador de diagnóstico precoce da doença, considerando que os pacientes apresentaram baixa parasitemia no limite de detecção por esfregaço sanguíneo e uma quantidade significativa de VEs no plasma (ANTWI *et al.*, 2020).

Com relação a diferenças no tamanho e abundância de VEs produzidas pelas cepas estudadas, não foram detectadas diferenças significativas independentemente do genótipo. Esses achados para *Acanthamoeba* diferem de um estudo anterior sobre *T. cruzi*, no qual cepas pertencentes a diferentes tipagem liberaram quantidades variáveis de VEs (NOGUEIRA *et al.*, 2015). Dentre as amostras desse estudo, a cepa Yuyu apresentou maior concentração e distribuição no tamanho das suas partículas quando comparada às demais cepas.

A análise de rastreamento de partículas (NTA), técnica usada no presente estudo, é considerada a mais atual e de referência para caracterização de VEs, permitindo determinar seu tamanho e concentração (THERY *et al.*, 2006). Ainda assim, ela não permite distinguir se a origem das partículas é celular ou proveniente de artefatos como agregados de componentes do meio. Nesse sentido, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma etapa complementar na caracterização das VEs, pois permite a visualização de aspectos morfológicos de células e estruturas celulares, demonstrando sua formação no citoplasma e sua presença na superfície celular. (THÉRY *et al.*,

2006). Adicionalmente, a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) permite ainda sugerir a natureza dos componentes presentes. Uma das etapas de preparo das amostras para a MET é o processo de pós-fixação e o composto utilizado foi o tetróxido de ósmio (OsO_4) que protege as lipoproteínas naturais dos tecidos evitando sua ruptura e coagulação. O ósmio estabiliza e contrasta especialmente os fosfolipídios constituintes da membrana citoplasmática. Atua sobre os ácidos graxos insaturados (com dupla ligação) desses fosfolipídios. Além da utilização do (OsO_4), o acetato de uranila e o chumbo utilizado na contrastação da amostra reage com estruturas lipídicas e proteicas, ou seja, as regiões mais escuras presentes nas imagens são correspondentes a estruturas lipídicas e proteicas, enquanto as mais claras, a sacarídeos (MOHAMMED1, ABDULLAH.,2019).

O conjunto envolvendo tanto a análise NTA, quanto os protocolos de isolamento baseados na filtração e ultracentrifugação, além da MEV e MET são técnicas consideradas válidas para indicar a produção de VEs, conforme preconizado (MISEV2018; THÉRY *et al.*, 2018). De acordo com os autores, pelo menos três técnicas de princípios diferentes devem ser usadas para aferir a liberação de VEs, condições que foram atendidas no presente trabalho.

Uma vez que a produção de VEs apresentou perfil homogêneo entre as diferentes cepas, a etapa seguinte foi avaliação de outras características funcionais que pudessem indicar possíveis diferenças. Dentre os diferentes genótipos de *Acanthamoeba*, há os mais propensos à causa infecções como o T4 e outros menos associados a casos clínicos, como por exemplo, o T11 (MACIVER *et al.*, 2013). Além disso, amostras de origem clínica (obtidas de casos de ceratite e encefalite) apresentam propriedades *in vitro*, como maior tolerância à alta osmolaridade, maior atividade de quantidade de proteases, citopatogenicidade para células de cultivo, dentre outras, que diferem das amostras ambientais não patogênicas (KHAN *et al.*, 2000; CIRELLI *et al.*, 2020)

Sabe-se que as proteases são elementos constitutivos produzidos por *Acanthamoeba*, independentemente de estarem em um processo patogênico ou em vida livre. Nesse último caso, as proteases são utilizadas nos processos alimentares, já que as amebas se alimentam de bactérias, outros microrganismos e partículas no meio (KHAN, 2006; MAGLIANO *et al.*, 2009). As

proteases também estão envolvidas no processo de encistamento de *Acanthamoeba*, pertencendo principalmente a classe de serinoproteases (WANG *et al.* 2020). A serinoprotease CSP21 é uma proteína específica envolvida no processo de revestimento do trofozoíto durante o encistamento. (KHAN, NAVEED AHMED, 2006). Em outros protozoários como *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*, proteases de outras classes, como as cisteína proteases, estão envolvidas no encistamento (MAKIOKA *et al.*, 2005),

A maioria dos estudos de proteases em *Acanthamoeba* foi realizada para caracterizar produtos excretados de trofozoítos, por meio de análise do meio condicionado, ou seja, o sobrenadante bruto do meio de cultivo. Apenas recentemente essas enzimas foram encontradas como parte de componentes carregados por VEs (GONÇALVES *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2019; RETANA-MOREIRA *et al.*, 2020). Confirmando esses achados, também detectamos atividades de proteases nas vesículas das quatro cepas em pH 7,4 e pH 3,5, indicando sua ação tanto em pH fisiológico quanto não fisiológico.

A inibição completa da atividade enzimática das VEs por PMSF, em ambos os pHs, indicou a predominância de serino proteases. As serino proteases são assim classificadas por apresentarem o aminoácido serina em seu sítio ativo (VERMELHO *et al.*, 2008). Em *Acanthamoeba*, algumas serinoproteases são bem caracterizadas, como a MIP133 (manose induced protein 133) que é uma proteína induzida por manose e que é capaz de induzir a apoptose de queratócitos presentes nas células da íris, dentre outras células da retina e córnea (CLARKE & NIEDERKORN, 2006a; b). Anticorpos produzidos contra MIP-133 foram capazes de inibir o efeito citopático de sobrenadantes de *Acanthamoeba* spp. e reduzir os sintomas da ceratite amebiana em cobaias imunizadas (HURT *et al.*, 2003). Além disso, a clonagem e produção dessa proteína recombinante adicionando um marcador 6-histidina em seu terminal C foram expressas em células *E. coli* M15 e apresentaram resultados satisfatórios quanto a produção de anticorpos (ALIZADEH *et al.*, 2009).

Apesar de ser clara a predominância de serinoproteases nas VEs, cisteína e metaloproteases também foram encontradas em menor intensidade de atividade, conforme experimentos de inibição com E64 e EDTA. Tanto em

estudos com o meio condicionado (KHAN *et al.*, 2006; SERRANO-LUNA *et al.*, 2006; SISSON *et al.*, 2004; CIRELLI *et al.*, 2020), quanto com VEs isoladas (GONÇALVES *et al.*, 2018; RETANA-MOREIRA *et al.*, 2020), o padrão de maior atividade de serinoproteases e menor atividade das outras duas classes é observado, o que corrobora com os resultados obtidos com as VEs das quatro cepas nesse trabalho.

Comparando os quatro isolados, os perfis zimográficos foram similares em relação ao número de bandas, indicando um padrão para a expressão nas condições experimentais utilizadas. No entanto, comparando as quatro cepas, foi clara a maior atividade proteolítica em VEs das cepas ALX (T4) e R2P5 (T1). Em teoria, a variação no secretoma de cepas distintas de *Acanthamoeba* poderia refletir variações em sua virulência. Isso tem sido sugerido em estudos que relacionam maior atividade de proteases excretadas em cepas patogênicas em comparação com cepas não patogênicas (KHAN *et al.*, 2000; CIRELLI *et al.*, 2020). A ALX pode ser considerada uma cepa patogênica devido à sua origem clínica (caso ceratite amebiana) e tolerância à alta temperatura e osmolaridade (42°C e 1M) (DUARTE *et al.*, 2013). Embora tenha a sua origem ambiental, a cepa R2P5 é caracterizada como patogênica pelos seguintes motivos: (1) sua termotolerância (superior a 40°C) e citopatogenicidade em células MDCK (POSSAMA *et al.*, 2018), (2) sua classificação como genótipo T1, que eventualmente está associado a casos de encefalite (ALSAM *et al.*, 2005; SISSON *et al.*, 2004), (3) secreta maiores quantidades de proteases que proteases provenientes de cepas de casos clínicos de ceratite amebiana (CIRELLI *et al.*, 2020). Por outro lado, AR15 (genótipo T11) é uma cepa ambiental considerada não patogênica por alguns parâmetros fenotípicos (DUARTE *et al.*, 2013). Já a cepa de referência AP4 (genótipo T2), por sua vez, é um isolado de água doce com potencial patogênico mais brando, uma vez que apresentou características de baixa patogenicidade em um estudo (DA ROCHA-AZEVEDO E COSTA E SILVA-FILHO, 2007), mas foi capaz de induzir experimentalmente doença pulmonar em ratos (VERÍSSIMO *et al.*, 2013). Considerando esses aspectos, as atividades de proteases mais elevadas em ALX e R2P5 indicaram que os VEs podem afetar em parte a patogenicidade expressa nessas amebas.

Recentemente, foi demonstrado que cisteína e serinoproteases de *Acanthamoeba* estão envolvidas na indução de citocinas e na ativação de PAR1 em macrófagos murinos (CANO *et al.*, 2019). Nesse contexto, avaliamos o papel das VEs com diferentes perfis enzimáticos apresentados na zimografia e seu possível efeito pró-inflamatório desencadeados pela estimulação de macrófagos intraperitoneais de murinos. Sabe-se que os VEs liberados por outros parasitas expressam moléculas que exercem papel crucial nos mecanismos imunomoduladores (TORRECILHA *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2018; BARBOSA *et al.*, 2018; NOGUEIRA *et al.*, 2015; 2020).

Estudos anteriores envolvendo *Acanthamoebae* imunidade inata, avaliaram o efeito dos protozoários em vários componentes, incluindo TLRs, citocinas e fatores nucleares (RENE *et al.*, 2010; DERDA *et al.*, 2016; WOJTKOWIAK-GIERA *et al.*, 2016, CANO *et al.*, 2017). Nesses estudos, utilizando os trofozoítos íntegros estimulação, ficou evidente a participação dos receptores TLR4 e TLR2 como reconhecedores de *Acanthamoeba*. No presente estudo, usando macrófagos murinos e seus respectivos nocautes, confirmamos o receptor TLR4 como o principal receptor para VEs de *Acanthamoeba* e secundariamente TLR2. Isso indica que VEs carregam diferentes tipos de PAMPs que são importantes para a ativação do sistema imune inato e que pode envolver distintas vias durante as interações patógeno-hospedeiro.

Em um trabalho anterior, vesículas extracelulares de *A. castellanii* foram capazes de estimular células THP-1 humanas a produzir citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 e IL-12 (LIN *et al.*, 2019). Em nossos estudos, as VEs foram testadas em relação à indução de NO, TNF- α e IL-6, variando entre as cepas. As VEs da cepa ambiental AR15 (genótipo T11) induziram maior nível de estimulação pró-inflamatória em comparação com as outras amostras. Assim como em outros protozoários como *Trypanosoma cruzi* (NOGUEIRA *et al.*, 2015), isso reforça que as VEs de *Acanthamoeba* apresentam propriedades imunomoduladoras dependendo da cepa. As VEs de protozoários parasitas apresentam uma grande quantidade de moléculas e uma análise proteômica poderia elucidar a variação de patogenicidade entre as espécies. Por exemplo, as VEs do *T. cruzi* de diferentes cepas mostram diferenças nos epítomos e na quantidade das proteínas, resultando na modulação diferencial de todo o

sistema imunológico (NOGUEIRA *et al.*, 2015). Para *Acanthamoeba*, os mecanismos subjacentes à ativação diferencial de macrófagos pelas VEs, ainda estão em estudos iniciais.

A capacidade de induzir maiores níveis de NO por VEs da cepa ambiental AR15 chamou a atenção, pois justamente as VEs de cepa pertencente a um genótipo menos provável de causar infecção (T11) demonstraram um perfil pró-inflamatório mais elevado. Da mesma forma, macrófagos derivados da medula óssea murina co-cultivados com uma cepa laboratorial de baixa patogenicidade de *Acanthamoeba* induziram níveis mais elevados de IL-12 e IL-6 do que um isolado clínico (CANO *et al.*, 2017). Em conjunto, esses achados são consistentes com a ideia de que cepas de *Acanthamoeba* não patogênicas poderiam induzir uma ativação pró-inflamatória como IL-17, favorecendo a destruição precoce pelo sistema imunológico inato. Por outro lado, a infectividade de cepas patogênicas pode estar relacionada à baixa produção de citocinas, contribuindo para a persistência no hospedeiro. Novos estudos com um painel mais amplo de marcadores imunológicos, envolvendo mais cepas e com investigação de outros elementos-chave das vias imunológicas inatas, como MAPKs e NF-KB, podem confirmar essa hipótese. Além disso, é importante reforçar a limitação de experimentos *in vitro*, já que os mecanismos da infecção são multifatoriais e dependentes também do hospedeiro. Nesse sentido, experimentos *in vivo* poderiam também auxiliar a melhor compreender a patogênese de *Acanthamoeba* relacionada à diversidade de cepas.

Considerando que as VEs de *Acanthamoeba* carregam proteases, conforme demonstrado recentemente e em estudos anteriores (GONÇALVES *et al.*, 2019) e que essas enzimas estão envolvidas na ativação de componentes da resposta imune inata (CANO *et al.*, 2019), foi realizado um ensaio adicional de estimulação de NO, comparando VEs não tratadas com VEs tratadas por inibidores de proteases e por aquecimento. Com base nos resultados, foi muito claro o papel das proteases na indução de NO por macrófagos. A inibição de proteases corroborou com os zimogramas e foram predominantemente dependentes de serinoproteases e em menor extensão de metalo e cisteína proteases. Ambos os genótipos usados nesse ensaio são patogênicos, então outros fatores desconhecidos podem estar envolvidos e talvez sejam

específicos de cada cepa. Nitidamente, a capacidade de desencadear a secreção de NO e citocinas era maior no isolado ambiental AR15, nesse contexto, podemos sugerir que isso estaria envolvido no seu reconhecimento inicial. Estudos com outras abordagens imunológicas e envolvendo mais cepas podem confirmar essa hipótese.

7. CONCLUSÃO

- A similaridade no perfil de tamanho modal e a concentração de VEs produzidas pelas quatro cepas de *Acanthamoeba* nesse trabalho, indicam que o processo de vesiculação representa um padrão no gênero, que é independente da origem (ambiental ou clínica) e do genótipo (patogênico ou não patogênico).
- Os aspectos morfológicos dos trofozoítos e das VEs obtidos na microscopia eletrônica de varredura e na microscopia eletrônica de transmissão é similar entre os genótipos e baseando no tamanho e na origem não é possível determinar a qual classe pertence, sendo então adotado o termo genérico de vesículas extracelulares de *Acanthamoeba*.
- Todas as cepas produzem vesículas morfolologicamente semelhantes que apresentam conteúdo variado de proteases com potencial de levar à produção de resposta pró-inflamatória por macrófagos murinos.
- As VEs das quatro cepas de *Acanthamoeba* apresentam um perfil zimográfico similar e carregam proteases com predominância de serinoproteases, sendo corroborada e demonstrada em estudos anteriores. No entanto, a atividade mais intensa de proteases se correlacionou com características de maior patogenicidade das cepas.
- As VEs de *Acanthamoeba* exibem efeitos imunomoduladores que variam dependendo da cepa e são dependentes da integridade das proteases. Os dados obtidos indicaram um efeito pró-inflamatório maior para a cepa de menor patogenicidade, indicando que funcionalmente, as VEs de *Acanthamoeba* tem características que refletem a diversidade no gênero, o que pode ter relação com a resposta do hospedeiro frente a infecção.

8. REFERÊNCIAS

AKSOZEK, A. *et al.* Resistance of *AcanthamoebaCastellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *The Journal of Parasitology*, v. 88, n. 3, p. 621–3, jun. 2002. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/00223395%282002%29088%5B0621%3AROACCT%5D2.0.CO%3B2>>

AKYA, A.; *et al.* *Listeria monocytogenes* does not survive ingestion by *Acanthamoebapolyphaga*. *Microbiology*, v. 156, n. 3, p. 809–818, 1 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892759>>.

ALFIERI, S. C. *et al.* Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Journal of Parasitology*, v. 86, n. 2, p. 220–227, abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10780536>>.

ALIZADEH, H. *et al.* Modulation of corneal and stromal matrix metalloproteinase by the mannose-induced *Acanthamoeba* cytolytic protein. *Experimental eye research*, v. 87, n. 3, p. 286–91, set. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014483508001917>>.

ANTWI-BAFFOUR S, *et al.* Plasma mEV levels in Ghanain malaria patients with low parasitaemia are higher than those of healthy controls, raising the potential for parasite markers in mEVs as diagnostic targets. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2020<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32002165/>>

APARECIDA DA SILVA, M.; *et al.* Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. *Revista de Saude Publica*, v. 37, n. 2, p. 242–246, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26589738>>.

ATAYDE, V. D. *et al.* Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan *Leishmania* within the Sand Fly Midgut. *Cell Reports*, v. 13, n. 5, p. 957–967, 3 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26565909>>.

BARTENEVA, N. S.; *et al.* Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, p. 49, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24032108>>.

BHATNAGAR, S. *et al.* Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*, v. 110, n. 9, p. 3234–44, 1 nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17666571>>.

BOBRIE, A. *et al.* Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, v. 12, n. 12, p. 1659–68, dez. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x>>.

BOWERS, B.; *et al.* The fine structure of *Acanthamoeba Castellani*. I. The trophozoite. *The Journal of Cell Biology*, v. 39, n. 1, p. 95–111, out. 1968. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5678452>>.

BROWN, A. C. *et al.* Risk Factors for *Acanthamoeba* Keratitis—A Multistate Case–Control Study, 2008–2011. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*, p. 1, jan. 2017. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00140068-900000000-99378>>.

CALIOT, J. *et al.* Apport diagnostique et thérapeutique des prélèvements microbiologiques des abcès de cornées avec critères de gravité au CHU de Reims entre 2012 et 2014. *Journal Français d’Ophtalmologie*, v. 40, n. 1, p. 8–16, 15 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27989423>>..

CALIXTO, G. *et al.* Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: preparation and characterization. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 20, n. 4, p. 490–496, 19 maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25975700>>.

CANO, A., *et al.* (2019). *Acanthamoeba* proteases contribute to macrophage activation through PAR₁, but not PAR₂. *Parasite Immunology*, 41, e12612. doi: 10.1111/pim.12612. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

CANO, A., MATTANA, *et al.*. (2017). *Acanthamoeba* Activates Macrophages

Predominantly through Toll-Like Receptor 4- and MyD88-Dependent Mechanisms To Induce Interleukin-12 (IL-12) and IL-6. *Infection and Immunity*, 85, e01054-16. doi:10.1128/IAI.01054-16Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2490036738>>.

CAMPOS, J. H. *et al.* Extracellular Vesicles: Role in Inflammatory Responses and Potential Uses in Vaccination in Cancer and Infectious Diseases. *Journal of Immunology Research*, v. 2015, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26380326>>.

CARLESSO, A. M. *et al.* [Isolation and identification of potentially pathogenic free-living amoebae in samples from environments in a public hospital in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 3, p. 316–20, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17653468>>..

CHAVATTE, N. *et al.* Free-living protozoa in the gastrointestinal tract and feces of pigs: Exploration of an unknown world and towards a protocol for the recovery of free-living protozoa. *Veterinary Parasitology*, v. 225, p. 91–98, 30 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27369581>>..

CIRELLI, C., *et al.* Extracellular protease profile of *Acanthamoeba* after prolonged axenic culture and after interaction with MDCK cells. *Parasitology Research*, 119(2), 659-666. doi: 10.1007/s00436-019-06562-w. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

CHOMICZ, L. *et al.* *Acanthamoeba Castellani*: in vitro effects of selected biological, physical and chemical factors. *Experimental Parasitology*, v. 126, n. 1, p. 103–5, set. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489410000391>>.

CHRISMAN, C. J.; *et al.* Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by, and Nonlytic Exocytosis from, *Acanthamoeba Castellani*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 18, p. 6056–6062, 15 set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20675457>>.

CLARKE, D. W.; *et al.* Intracorneal instillation of latex beads induces

macrophage-dependent protection against *Acanthamoeba* keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 47, n. 11, p. 4917–25, nov. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17065507>>.

COCUCCI, E.; *et al.* Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in Cell Biology*, v. 19, n. 2, p. 43–51, fev. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892408002833>>.

COLOMBO, M.; *et al.* Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 30, n. 1, p. 255–289, 11 out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25288114>>.

CORSARO, D. *et al.* *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba* micheli sp. nov. (genotype T19). *Parasitology Research*, v. 114, n. 7, p. 2481–2490, 15 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25869957>>.

CORSARO, D.; *et al.* Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitology research*, v. 107, n. 1, p. 233–8, 22 jun. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-010-1870-6>>.

CURSONS, R. T. *et al.* Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of cell-mediated immunity. *Infection and Immunity*, v. 29, n. 2, p. 408–10, ago. 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7011975>>.

CVJETKOVIC, A.; *et al.* The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 3, n. 0, 25 mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24678386>>.

DA ROCHA-AZEVEDO, *et al.* Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 2009, p. 1–14, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19657454>>.

DA SILVA, M. A.; DA ROSA, J. A. [Isolation of potentially pathogenic free-living

amoebas in hospital dust]. *Revista de Saude Publica*, v. 37, n. 2, p. 242–6, abr. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700848>>.

DERDA, M., *et al.* *Acanthamoeba* infection in lungs of mice expressed by toll-like receptors (TLR2 and TLR4). *Experimental Parasitology*, 165, 30-34. doi: 10.1016/j.exppara.2016.02.012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

DEARBORN, *et al.*. Lipophosphoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba Castellani*. Fatty acid composition. *The Journal of biological chemistry*, v. 249, n. 11, p. 3342–6, 10 jun. 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4831217>>.

DOWELL, J. D. *et al.* AIDS Presenting as Granulomatous Amebic Encephalitis: PET and MR Imaging correlation. *Journal of Neuroimaging*, v. 25, n. 6, p. 1047–1049, nov. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25678445>>.

DOYLE LM, *et al.* Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*. 2019;8:727. - PMC - PubMed. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

DUARTE, J. L. *et al.* Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. *Experimental Parasitology*, v. 135, n. 1, p. 9–14, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.013>>.

ERTABAKLAR, H. *et al.* [Case report: *Acanthamoeba* keratitis]. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, v. 33, n. 4, p. 283–5, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20101578>>.

FERRANTE, A. & ROWAN-KELLY, B. (1983). Activation of the alternative pathway of complement by *Acanthamoeba culbertsoni*. *Clinical Experimental Immunology* 54: 477-485. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

FERRANTE, A. (1991). Free-living amoebae: pathogenicity and immunity.

Parasit. Immunol. 13: 31-47. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

FUERST, P. A.; *et al.* Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 69–84, jan. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jeu.12186>>.

GONÇALVES, D.S., *et al.* Extracellular vesicles and vesicle-free secretome of the protozoa *Acanthamoebacastellanii* under homeostasis and nutritional stress and their damaging potential to host cells. *Virulence*, 9, 818-836. doi: 10.1080/21505594.2018.1451184. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

HRISTOV, M. *et al.* Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, v. 104, n. 9, p. 2761–6, 1 nov. 2004. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2003-10-3614>>

HURT, M; NEELAM, *et al.* Pathogenic *Acanthamoeba* spp. secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. *Infection and Immunity*. v.71 p.6243–6255, 2003b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

KHAN, N. A. *et al.* Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 8, p. 2858–61, ago. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10921939>>.

KHAN, N.A.; *et al.* Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Current Microbiology*. v.45 n.3 p.197-202, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

KHAN N. A. *et al.* Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbial Pathogenesis*. v.34, p.277- 285, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

KHAN, N.A.; *et al.* Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and

pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. *Folia Parasitol (Praha)*. v.50 n.2 p.97-104, 2003. KHAN, N.A. *Acanthamoeba* biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*. v.30, p.564-595, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

KHAN, *et al.* *Acanthamoeba*: Biology and Pathogenesis, book Caister Academic Press Limited; Illustrated edição. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

KHATUA, A. K. *et al.* Exosomes packaging APOBEC3G confer human immunodeficiency virus resistance to recipient cells. *Journal of Virology*, v. 83, n. 2, p. 512–21, 15 jan. 2009. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01658-08>>.

KLEMBBA, M.; *et al.* Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annual Review of Biochemistry* v.71, p.275-305, 2002.

KINDE, H. *et al.* Infections caused by pathogenic free-living amebas (*Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* sp.) in horses. *Journal of Veterinary Diagnostic investigation* v. 19, n. 3, p. 317–22, maio 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459867>>.

KOESHLER, M.; *et al.* *Acanthamoeba Castellani*: growth on human cell layers reactivates attenuated properties after prolonged axenic culture. characterization and differentiation of pathogenic and non-pathogenic *Acanthamoeba* strains by their protein and antigen profile. *FEMS Microbiology Letters*. v.299 n.2, p.121-127, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

LEVINE, N. D. *et al.* A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology*, v. 27, n. 1, p. 37–58, fev. 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6989987>>.

LEWIS JM, *et al.* Integrated analysis of exosomal protein biomarkers on alternating current electrokinetic chips enables rapid detection of pancreatic cancer in patient blood. *ACS Nano*. 2018;12(4):3311–3320. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.7b08199> [PubMed]

LIN, W.C., *et al.* Quantitative proteomic analysis and functional characterization of *Acanthamoeba Castellani* exosome-like vesicles. *Parasites & Vectors*, 12, 467. doi: 10.1186/s13071-019-3725-z. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

LLOYD, Det *al.* Oxygen affinity of the respiratory chain of *Acanthamoeba Castellani*. *The Biochemical Journal*, v. 214, n. 1, p. 47–51, 15 jul. 1983. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6615472>>.

LORENZO-MORALES, J. *et al.* RNA interference (RNAi) for the silencing of extracellular serine proteases genes in *Acanthamoeba*: Molecular analysis and effect on pathogenicity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 144, n. 1, p. 10–15, nov. 2005. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16105699>>..

MACIVER, S. K. *et al.* A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. *European Journal of Protistology*, v. 49, n. 2, p. 217–221, 2013. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejop.2012.11.004>>.

MAGLIANO, A.C., *et al.* Genotyping, physiological features and proteolytic activities of potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. Isolated from tap water in Brazil. *Experimental Parasitology*, 123, 231-235. doi: 10.1016/j.exppara.2009.07.006. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

MAGNET, A. *et al.* Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitology Research*, v. 113, n. 8, p. 2845–50, 25 ago. 2014. Disponible em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-014-3945-2>>.

MAKIOKA A, *et al.* *Entamoeba invadens*: cysteine protease inhibitors block excystation and metacystic development. *Exp Parasitol.* 2005;109:27–32. - PubMed. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

MANTEL, P.-Yet *al.* The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. *Cellular Microbiology*, v. 16, n. 3, p. 344–354, mar. 2014a. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24406102>>.

MARCIANO-CABRAL, F. *et al.* Interaction of an *Acanthamoeba* human isolate harboring bacteria with murine peritoneal macrophages. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 50 Suppl, p. 516–9, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14736148>>.

MARCILLA, A. *et al.* Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PloS One*, v. 7, n. 9, p. e45974, 24 set. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0045974>>.

MARTINEZ, A. J.; *et al.* Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, v. 7, n. 1, p. 583–98, jan. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9034567>>.

MENCK, K. *et al.* Isolation and Characterization of Microvesicles from Peripheral Blood. *Journal of Visualized Experiments*, n. 119, 6 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28117819>>.

MENGUE, L. *et al.* Legionella pneumophila prevents proliferation of its natural host *Acanthamoebacastellani*. *Scientific Reports*, v. 6, p. 36448, 2 nov. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

M.F. GONÇALVES, *et al.*, *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles, *Experimental Parasitology* 72 (1991) 43e53. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

MOHAMMED1, *et al.*...Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. Conference: Proceedings of International Conference on HYDRAULICS, PNEUMATICS, SEALING ELEMENTS, TOOLS, PRECISION MECHANICS, SPECIFIC ELECTRONIC EQUIPMENT & MECHATRONICS. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2358967738>>.

MULLER, M. *et al.* RIM Controls Homeostatic Plasticity through Modulation of the Readily-Releasable Vesicle Pool. *Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 47, p. 16574–16585, 21 nov. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23175813>>.

NIYYATI, M.; *et al.* Current Status of *Acanthamoeba* in Iran: A Narrative Review

Article. Iran J Parasitol. v.10 n.2 p.157-63, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24966538>>.

NOGUEIRA, P.M., *et al.* Immunomodulatory properties of *Leishmania* extracellular vesicles during host-parasite interaction: differential activation of TLRs and NF- κ B translocation by dermatropic and viscerotropic species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 380. doi: 10.339/fcimb.2020.00380 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

NOGUEIRA, P.M., *et al.* Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 28734. [dx.doi.org/10.3402/jev.v4.28734](https://doi.org/10.3402/jev.v4.28734). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

NUPRASERT, W. *et al.* Identification of a novel t17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and t10 genotype causing keratitis in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 12, p. 4636–40, dez. 2010. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01090-10>>.

OMAÑA-MOLINA M1, *et al.* Reevaluating the role of *Acanthamoeba* proteases in tissue invasion: observation of cytopathogenic mechanisms on MDCK cell monolayers and hamster corneal cells. *Biomed Res Int.* 2013;2013:461329. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

PADZIK, M. *et al.* In vitro effects of selected contact lens care solutions on *Acanthamoeba Castellani* strains in Poland. *Experimental Parasitology*, v. 145, p. S98–S101, nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967738>>.

PAGE, F. . *A New Key to FRESHWATER AND SOIL GYMNAMOEBAE*. [S.l.: s.n.], 1988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30637094/>

PARQUE, M.K.; *et al.* *Acanthamoeba* Protease Activity Promotes Allergic Airway Inflammation via Protease-Activated Receptor 2. *PLoS One*. v.9 n.3, e92726, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30637094/>

PM, N. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses.No Title. *Extracellular Vesicles.*, 2015.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26613751>>.

POSSAMAI, C.O., *et al.* *Acanthamoeba* of three morphological groups and distinct genotypes exhibit variable and weakly inter-related physiological properties. *Parasitology Research*, 117, 1389-1400. doi: 10.1007/s00436-018-5824-8

PUSSARD, M.; PONS, R. *Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre Acanthamoeba*. [S.l: s.n.], 1977. Disponível em : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30637094/>

RADFORD, C. F.; *et al.* *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *The British Journal of Ophthalmology*, v. 86, n. 5, p. 536–42, maio 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11973250>>.

RAPOSO, G.; *et al.* Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, v. 200, n. 4, p. 373–83, 18 fev. 2013. Disponível em: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201211138>

REN, M., *et al.* TLR4: the receptor bridging *Acanthamoeba* challenge and intracellular inflammatory responses in human corneal cell lines. *Immunology & Cell Biology*, 88, 529-536. doi: 10.1038/icb.2010.6. Disponível em : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30637094/>

REN, M.Y., *et al.* Toll-like receptor 4 signalling pathway activation in a rat model of *Acanthamoeba* Keratitis. *Parasite Immunology*, 33, 25-33. doi: 10.1111/j.1365-3024.2010.01247.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30637094/>

RETANA-MOREIRA, L. *et al.* Isolation and Molecular Characterization of *Acanthamoeba* Strains from Dental Units in Costa Rica. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 62, n. 6, p. 733–736, nov. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25959994>>.

SCHAUMBERG, D. A.; *et al.* The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: where do we stand? *Cornea*, v. 17, n. 1, p. 3–10, jan. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9436873>>.

SCHUSTER, F. L.; *et al.* Amebae and ciliated protozoa as causal agents of

waterborne zoonotic disease. *Veterinary Parasitology*, v. 126, n. 1-2, p. 91–120, 9 dez. 2004a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15567581>>.

SCHUSTER, F. *et al.*. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, v. 34, n. 9, p. 1001–1027, ago. 2004b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15313128>>.

SEAL, D.V. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye* v.17 p.893–905, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30637094/>

SERRANO-LUNA, J. DE J. *et al.* Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba Castellani*. *Canadian journal of microbiology*, v. 52, n. 1, p. 16–23, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/w05-114>>.

SIDDIQUI, R.; *et al.*. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*, v. 5, n. 1, p. 6, 10 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229971>>.

SIDDIQUI, R. *et al.* Area 51: How do *Acanthamoeba* invade the central nervous system? *Trends in Parasitology*, v. 27, n. 5, p. 185–189, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30637094/>

SILVERMAN, J. M.; *et al.*. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cellular Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 1–9, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21040357>>.

SISSONS, J. *et al.* *Acanthamoeba Castellani* induces host cell death via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Infection and immunity*, v. 73, n. 5, p. 2704–8, 1 maio 2004. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.73.5.2704-2708.2005>>.

STEWART, G. *et al.*. Chemotactic response of macrophages to *Acanthamoeba Castellani* antigen and antibody-dependent macrophage-mediated killing of the parasite. *J. Parasitol.* 78: 849- 855

STOORVOGEL, W. *et al.* The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*

(Copenhagen, Denmark), v. 3, n. 5, p. 321–30, maio 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11967126>>.

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, n. 1, p. 45–54, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9495032>>.

SOARES, R.P., *et al.* *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *International Journal for Parasitology*, 35, 245-253. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.12.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30637094/>

SOARES, *et al.* Highlights of the São Paulo ISEV workshop on extracellular vesicles in cross-kingdom communication. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6, 1407213. doi: 10.1080/2001078.2017.1407213

THAMTAM, V. *et al.* Fatal granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a newly diagnosed patient with systemic lupus erythematosus. *Neurology India*, v. 64, n. 1, p. 101, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26755000>>.

THÉRY, C. *et al.* Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006. v. Chapter 3. p. Unit 3.22. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18228490>>.

THÉRY C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles*. 2018;7:1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30637094/>

TKACH, M., & THÉRY, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*, 164, 1226-1232. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.043. Disponível: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26967288/>

TONEY, D.M. & Marciano-Cabral F. (1998). Resistance of *Acanthamoeba* species to complement lysis. *J. Parasitol.* 84: 338-44. Disponível: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9576508/#:~:text=Acanthamoeba%20species%20were%20evaluated%20for,3%20Acanthamoeba%20species%20tested%20C%20A.&text=polyphaga%20\(ATCC%2030461\)%20depleted,resistant%20to%20its%20lytic%20effects.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9576508/#:~:text=Acanthamoeba%20species%20were%20evaluated%20for,3%20Acanthamoeba%20species%20tested%20C%20A.&text=polyphaga%20(ATCC%2030461)%20depleted,resistant%20to%20its%20lytic%20effects.)

TORNO, M. S. *et al.* Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 42, n. 2 Pt 2, p. 351–4, fev.2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640931>>.

TOLEDO, M.S., *et al.* Effects of extracellular vesicles released by peritoneal B-1 cells on experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 2020, 1-12. doi: 10.1002/JLB.3MA0220-464RR. Disponível: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/41308>

TORRECILHAS, A. C. *et al.* Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes and infection*, v. 14, n. 15, p. 1465–74, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22892602>>.

TWU, O. *et al.* Trichomonas vaginalis Exosomes Deliver Cargo to Host Cells and Mediate Host : Parasite Interactions. v. 9, n. 7, p. 22–24, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27805070>>.

VALADI, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, v. 9, n. 6, p. 654–9, 7 jun. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncb1596>>.

VAN KLINK, F., *et al.* The role of macrophags in *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 1271-1281. Disponível: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8641830/>

WALKER, M. *et al.* Isolation and characterization of a secretory component of *Echinococcus multilocularis* metacestodes potentially involved in modulating the host-parasite interface. *Infection and immunity*, v. 72, n. 1, p. 527–36, jan. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688134>>.

WALOCHNIK, J.; *et al.* Correlations between morphological, molecular

biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Applied and environmental microbiology*, v. 66, n. 10, p. 4408–13, out. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11010891>>.

WANG, ZHIXIN, *et al.* Identification and biochemical characterisation of *Acanthamoeba Castellanii* cysteine protease 3. *Parasites & Vectors*. Disponível: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04474-8>

WEBER, S. S. *et al.* Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides* mycelia and yeast cells. *PloS one*, v. 7, n. 12, p. e52470, 18 dez. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0052470>>.

YANG, Y.; *et al.* Serine Proteases of Parasitic Helminths. *The Korean Journal of Parasitology* v.53 n.1, p.1-11, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4384789/#:~:text=A%20number%20of%20serine%20proteases,%2C%20anticoagulation%2C%20and%20immune%20evasion.>

YUEHUA, W.; *et al.* Current advances in diagnostic methods of *Acanthamoeba* keratitis. *Chinese Medical Journal* v.127, n.17, p.3165-3170, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25189964/>

YOUSUF, F. A.; *et al.* *Acanthamoeba Castellanii* of the T4 genotype is a potential environmental host for *Enterobacter aerogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Parasites & vectors*, v. 6, n. 1, p. 169, 7 jun. 2013. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-6-169>>. A

ZAMORA, A.; *et al.* *Acanthamoeba* encephalitis: A Case Report and Review of Therapy. *Surgical neurology international*, v. 5, n. 1, p. 68, 2014. Disponível em: <<http://www.surgicalneurologyint.com/text.asp?2014/5/1/68/132239>>.

9. ANEXOS

Anexo I. Publicação referente à tese

Distinct immunomodulatory properties of extracellular vesicles released by different strains of *Acanthamoeba*

Adriana Oliveira Costa¹ | Isabela Aurora Rodrigues Chagas¹ |
Armando de Menezes-Neto^{2,3} | Felipe Dutra Rêgo² | Paula Monalisa Nogueira² |
Ana Claudia Torrecilhas⁴ | Cinthia Furst³ | Blima Fux³ | Rodrigo Pedro Soares² 

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Instituto René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³Departamento de Patologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema, Diadema, São Paulo, Brazil

Correspondence

Adriana Oliveira Costa, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 30270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.
Email: adrincoستا@gmail.com

Rodrigo Pedro Soares, Instituto René Rachou, FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-009, Belo Horizonte, MG, Brazil.
Email: rodrigossoares28@hotmail.com

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: AUXPE 1526/2011; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2016-01917-3; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Grant/Award Number: APQ-01100-14 and PPM-X 00102-16; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Numbers: 302972/2019-6, 405336/2017-9 and 302104/2019-4

Abstract

Free living amoeba of the genus *Acanthamoeba* are opportunist protozoan involved in corneal, systemic, and encephalic infections in humans. Most of the mechanisms underlying intraspecies variations and pathogenicity are still unknown. Recently, the release of extracellular vesicles (EVs) by *Acanthamoeba* was reported. However, comparative characterization of EVs from distinct strains is not available. The aim of this study was to evaluate EVs produced by *Acanthamoeba* from different genotypes, comparing their proteases profile and immunomodulatory properties. EVs from four environmental or clinical strains (genotypes T1, T2, T4, and T11) were obtained by ultracentrifugation, quantitated by nanoparticle tracking analysis and analyzed by scanning and transmission electron microscopy. Proteases profile was determined by zymography and functional properties of EVs (measure of nitrite and cytokine production) were determined after peritoneal macrophage stimulation. Despite their genotype, all strains released EVs and no differences in size and/or concentration were detected. EVs exhibited a predominant activity of serine proteases (pH 7.4 and 3.5), with higher intensity in T4 and T1 strains. EVs from the environmental, nonpathogenic T11 strain exhibited a more proinflammatory profile, inducing higher levels of Nitrite, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 via TLR4/TLR2 than those strains with pathogenic traits (T4, T1, and T2). Preincubation with EVs treated with protease inhibitors or heating drastically decreased nitrite concentration production in macrophages. Those data suggest that immunomodulatory effects of EVs may reflect their pathogenic potential depending on the *Acanthamoeba* strains and are dependent on protease integrity.

KEYWORDS

genotypes, host-parasite interaction, innate immunity, proteases

Abbreviations: AK, amoebic keratitis; E64, trans-Epoxy succinyl-L-leucylamide(4-guanidino)butane; EDTA, ethylene diamine tetra acetic acid; EV, extracellular vesicles; GAE, granulomatous amoebic encephalitis; LPS, lipopolysaccharide; NTA, nanoparticle tracking analysis; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; PBS, phosphate-buffered saline; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; SEM, scanning electron microscopy; TEM, transmission electron microscopy; TLR, toll-like receptor.

Adriana Oliveira Costa and Isabela Aurora Rodrigues Chagas contributed equally for this work.

1 | INTRODUCTION

The genus *Acanthamoeba* is a part of a group generically denominated potentially pathogenic free-living amoeba that eventually cause infections in humans and other vertebrates (Schuster & Visvesvara, 2004). *Acanthamoeba* is considered the most common and is found ubiquitously in natural and artificial environments (Siddiqui & Khan, 2012).

Acanthamoeba infection may result in amoebic keratitis (AK), a progressive corneal infection leading to partial or total loss of sight. An increasing incidence of AK has been reported in the last decades, especially associated to contact lenses users with inadequate habits of handling or cleaning (Brown et al., 2017; Lorenzo-Morales et al., 2013). Several localized studies estimated 1.36 and 17–21 cases of AK per million in contact lens users in the United States and United Kingdom, respectively (Seal, 2003). In the Netherlands, the incidence was estimated to be 1 in 21,000 in 2015 (Randag et al., 2019).

Acanthamoeba also causes a severe central nervous system infection, known as granulomatous amoebic encephalitis (GAE). GAE occurs predominantly in immunocompromised patients and develops from previous cutaneous lesions or systemic infection reaching high fatality rates (90%; Chomicz et al., 2010; Kalra et al., 2020; Marciano-Cabral & Cabral, 2003). A recent study on GAE occurrence in scientific databases (1990 to 2018) identified 69 cases caused by *Acanthamoeba* (Kalra et al., 2020).

Despite the ubiquity of *Acanthamoeba* and its continuous contact with humans, AK and GAE are considered rare if compared to other infectious diseases. The factors favoring pathogenicity in this protozoan include somatic and excreted factors that allow trophozoites to interact with host cells and survive in the host tissues. Phenotypic expression of those factors is related to the diversity within the genus *Acanthamoeba*, which can be classified in genotypes T1 to T20 based on the 18S recombinant DNA (rDNA) sequence. The genotype T4, the most common in cases of AK or GAE (Fuerst et al., 2015; MacIver et al., 2013), indicating a greater propensity for certain strains to cause infections.

Pathogenic *Acanthamoeba* initiate the invasive process by adhesion of amoebic mannose-binding receptors to mannosylated glycoproteins of host cells (Neelam & Niederkorn, 2017). This early interaction will result in the release of proteases, which are determinant for extracellular matrix disruption and cell death by necrosis and apoptosis (Clarke et al., 2006; Neelam & Niederkorn, 2017). *Acanthamoeba* can predominantly produce serine proteases and less amounts of cysteine and metalloproteases with intraspecies polymorphisms (Cirelli et al., 2020; Khan, 2006; Serrano-Luna et al., 2006; Sissons et al., 2006). Proteases can induce interleukin (IL)-12 production via the protease-activated receptor 1 (PAR₁) in murine macrophages and IL-6 via a PAR-independent pathway (Cano et al., 2019). The mechanisms underlying proteases release in the extracellular matrix may include the direct release by the parasite or their packaging as extracellular cargo. Extracellular vesicles (EVs) are a heterogeneous group of particles released by eukaryotic and prokaryotic cells involved in several physiological/

pathological processes including intercellular communication, nutrition, and modulation of gene expression (Campos et al., 2015; Tkach & Théry, 2016; Zemleni et al., 2017). EVs have been classified according to their intracellular biogenesis location into three main groups: (1) microvesicles (100 nm–1 μm), originated from direct budding of the plasma membrane, (2) exosomes, measuring (30–150 nm), formed by an endocytic pathway, and released after fusion of multivesicular bodies to the plasma membrane and, (3) apoptotic bodies (1–5 μm), formed by external buds from the plasma membrane (Théry et al., 2002, 2018). EVs cargo may include proteins (enzymes, transcription factors), glycoconjugates, lipids, and genetic material (messenger RNA [mRNA], microRNA and DNA; Raposo & Stoorvogel, 2013; Théry et al., 2018; Torrecilhas et al., 2012).

Recently, EVs were described as potential virulence factors in *Acanthamoeba* showing protease activity and causing cytotoxicity to culture cells (Gonçalves et al., 2018; Lin et al., 2019; Retana-Moreira et al., 2020). In other protozoans including *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*, EVs shed by parasitic cells are involved in the modulation of immune responses exhibiting inter and intraspecies variations (Atayde et al., 2016; Barbosa et al., 2018; Nogueira et al., 2015). In the case of *T. cruzi* and *Leishmania*, innate immune responses depend on TLR2 and TLR4 resulting in the induction of several cytokines and nuclear factor kappa B (NF-κB) translocation (Barbosa et al., 2018; Nogueira et al., 2020; Silverman & Reiner, 2011; Toledo et al., 2020). In *Acanthamoeba*, in vivo and in vitro studies have addressed this type of interaction with the innate immune compartment but using trophozoites. There are findings indicating an increased mRNA expression of TLR4, MyD88, IL-8, tumor necrosis factor alpha (TNF-α), IL-1β, and NF-κB in infected rat cornea and corneal cells lines interacted with trophozoites (Ren & Wu, 2011; Ren et al., 2010). In other studies, an increased TLR4/TLR2 expression in brain, lungs, and eyes of mice with cerebral and systemic acanthamoebiasis. Those data indicating that pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) from *Acanthamoeba* are recognized by the host (Derdá et al., 2016; Kot et al., 2019; Wojtkowiak-Giera et al., 2016). However, it is still unknown how *Acanthamoeba* EVs affect those mechanisms and whether the strain diversity could influence the pattern of immune stimulation.

As a part of a wider study on pathogen EVs, the aim of this study was to functionally compare EVs and their proteases cargo from distinct *Acanthamoeba* strains during interaction with murine macrophages.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ethics statement

BALB/c, C57BL/6 and respective knockouts (TLR2^{-/-} and TLR4^{-/-}) handling was in strict accordance with animal practice as defined by the Internal Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA) of Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Belo Horizonte, Minas Gerais (MG), Brazil (protocol P-17/14-2). This protocol followed the

guidelines of CONCEA/MCT. Knock-out mice handling protocol was approved by the National Commission on Biosafety (CTNBio; protocol no.: #01200.006193/2001-16).

2.2 | *Acanthamoeba* strains

Four clinical and environmental strains of *Acanthamoeba* from distinct genotypes were used. Physiological characterization (osmolarity and thermo-tolerance) and genotyping based on 18S rDNA were previously described (Duarte et al., 2013; Possamai et al., 2018; Table 1). Axenic cultures were grown at 32°C in PYG medium (20 g/L proteose peptone, 1 g/L yeast extract, 0.1 M glucose, 4 mM Mg₂SO₄, 0.4 mM CaCl₂, 3.4 mM sodium citrate, 0.05 mM Fe (NH₄)₂ (SO₄)₂ and 2.5 mM of each of Na₂HPO₄ and K₂HPO₄, pH 6.5) supplemented with 10 µg/ml of Enrofloxacin (Baytril®).

2.3 | EVs isolation

Trophozoites from cultures in exponential growth (72 h) were harvested by centrifugation (400g, 10 min) and washed twice in Pages's saline (2.5 mM NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 0.5 mM Na₂HPO₄, 40 mM CaCl₂, and 20 mM MgSO₄). Cells were quantified in Neubauer chamber and resuspended in 8 ml of defined serum-free Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) medium (pH 7.4), at a final concentration of 5 × 10⁶ trophozoites/ml. Samples were incubated at 37°C under agitation (180 rpm) for 2 h. Trophozoites were removed by centrifugation (400g, 10 min) and their viability was evaluated by trypan blue exclusion. Separation and concentration were performed following protocols described in the MISEV guidelines (Théry et al., 2018), with modifications. Briefly, the supernatant was centrifuged sequentially at 700g, 10 min at 20°C, and then at 2000g, 20 min, 4°C. The final supernatant was filtered through a 0.22 µm sterile cartridge. The EVs were finally pelleted by ultracentrifugation (100,000g) for 2 h at 4°C and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). Five microliters of each EVs samples were used to determine protein concentration by Bradford assay (Bio-Rad). Procedures described in this section and subsequent experiments with EVs are depicted in the workflow (Figure S1).

2.4 | Electronic microscopy

For scanning electron microscopy (SEM), trophozoites subjected to vesiculation were concentrated by centrifugation (400g, 10 min) and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2), containing sucrose 0.146 M and 5 mM CaCl₂, for 60 min at room temperature (RT). Amoebic cells were adhered on cover slips, dehydrated, critically point dried and gold coated as previously described (Nogueira et al., 2015; Soares et al., 2005). Samples were visualized and images photographed using a Field Emission FEI Quanta 250 FEG scanning electron microscope.

TABLE 1 Origin, physiological features, and genotype of *Acanthamoeba* strains

Isolate	Origin	Osmo-tolerance	Thermo-tolerance	Cytotoxic effect (CPE)	Secreted proteases	In vivo infectivity	Genotype	Classification
ALX ^{a,b}	Corneal scrape of an AK patient, Vitória ES, Brazil	1 M	42°C	NE	~ 0.8 U/ml	NE	T4	Pathogenic
R2P5 ^{b,c}	Domestic Dust, Vitória ES, Brazil	No growth at 1 M	40°C	10-50% (MDCK cells)	~ 2.4 U/ml	NE	T1	Pathogenic
AP4 ^{b,d,e}	ATCC 30872, Freshwater, Tuskegee, AL, EUA	NE	NE	Discret CPE (LLC-MK2 cells)	~ 0.6 U/ml	Pulmonary infection	T2	Moderately pathogenic
AR15 ^{b,d}	Domestic dust, Vitória ES, Brazil	0.5 M	37°C	NE	~ 0.5 U/ml	NE	T11	Nonpathogenic

Note: Genotypic and physiological characterization described in (a) Duarte et al. (2013), (b) Cirelli et al. (2020), (c) Possamai et al. (2018), and (d) Da Rocha-Azevedo and Costa e Silva-Filho (2007), (e) Verissimo et al. (2013).

Abbreviation: NE, Not evaluated.

Transmission electron microscopy was performed with pellet of washed trophozoites fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 (60 min, RT), postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in ethanol and embedded in Epon. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and visualized in a Spirit BioTWIN FEI, 120 kV electronic microscope at the Center of Microscopy of Federal University of Minas Gerais (UFMG).

2.5 | Nanoparticle tracking analysis (NTA)

To evaluate size, distribution, and concentration of EVs, NTA was performed in Nanosight NS300 instrument (Malvern Instruments Ltd.) equipped with a charge-coupled device camera and a 405-nm laser emitting a 60-mW beam. Detection threshold was set to 10, and blur and Max Jump Distance were set automatically. The samples of EVs were previously diluted 100-fold in PBS pH 7.2 and readings were taken in triplicate during 60 s at 25 frames per second. Samples of RPMI without trophozoites, and subjected to same condition of vesiculation protocols, were used as negative controls. The camera level was set to 10 and the temperature was monitored to 25°C.

2.6 | Zymography

Protease activity of EVs samples was evaluated through zymography assays, adapted from procedures of Alfieri et al. (2000), with modifications. EVs samples corresponding to 1 µg of protein was resolved in 10% polyacrylamide containing 0.1% gelatin as substrate (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis-gelatin). Five microliters of supernatant from the last step of ultra-centrifugation were used as controls. The run was performed for 2 h with voltage of 15 mA, in pH 7.4 (1.5 mM Tris Cl/SDS buffer). To partially characterize the proteases, samples were preincubated for 30 min at RT with 5 mM of the following protease inhibitors (Sigma-Aldrich): E64 [*trans*-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane], a cysteine protease inhibitor, ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA), a metalloprotease inhibitor and phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), a serine protease inhibitor. After fractionation of proteins, gels were hydrated with 2.5% Triton X-100 for 60 min and incubated in sodium acetate buffer (pH 3.5) or Tris 50 mM CaCl₂ buffer (pH 7.4) at 37°C for 24 h. The gels stained with coomassie brilliant blue (R-250) and then destained with methanol and acetic acid. Digestion areas were visualized as uncolored regions. The experiments were performed three times. Samples from three distinct vesiculation events were obtained for each strains and representative gels were chosen.

2.7 | Murine macrophage assays

Peritoneal macrophages were isolated after thioglycollate stimulation from BALB/c, C57BL/6 and respective knockouts (TLR2^{-/-} and

TLR4^{-/-}). Recovered cells were washed with ice cold RPMI without fetal bovine serum (FBS) and enriched by plastic adherence for 1 h at 37°C and 5% CO₂. After washing with fresh RPMI, 1 × 10⁵ cells were seeded in 200 µl of RPMI (2 mM glutamine, 50 U/ml of penicillin, and 50 µg/ml streptomycin) supplemented with 10% FBS, in 96-well culture plates. Plates were incubated for 5 h (37°C/5% CO₂), and the cells were primed with interferon-γ (IFN-γ; 0.5 ng/ml) for 18 h before EVs stimulation. Each replicate was composed of three individual preparations of EVs. EVs (5 × 10⁸ particles/ml) were incubated with the murine macrophages for 48 h. Positive controls included lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (LPS-TLR4+; 100 ng/ml) and *Staphylococcus aureus* extract (S.a.-TLR2+; 100 ng/ml). Negative control included medium with IFN-γ. Nitrite concentration (NO) was determined by Griess Reaction (Griess Reagent System, 2009), as previously described (Nogueira et al., 2015). For protease inhibition assays, macrophages were plated in the same conditions above and exposed with EVs (5 × 10⁸ particles/ml) pretreated or not with protease inhibitors (PMSF, EDTA, and E64, 5 mM) for 30 min. Also, another group included heated EVs (100°C, 5 min). RPMI medium and LPS were used as negative and positive controls, respectively.

TNF-α and IL-6 were determined in assays with C57BL/6 macrophages using BD CBA Mouse Cytokine Assay kits according to the manufacturer's specification (BD Biosciences). Flow cytometry measurements were performed on a FACSCalibur flow cytometry (BD Bioscience). Cell-Quest™ software package provide by the manufacturer was used for data analysis (1200 events). FlowJO software 7.6.4 (Tree Star, Inc.) was used for data analysis. Results were expressed as the mean ± SD of two independent experiments in triplicate.

2.8 | Statistical analysis

To compare EVs and protein concentrations, the one-way ANOVA test for normal distribution was conducted with the software GraphPad Prism 5.0, considering a significance level of 5%. Murine macrophage assays were evaluated through nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test for multiple comparisons among groups (lines above bars). Student's *t* test was used to compare each sample and letters above bars indicate statistical differences (*p* < .05; Nogueira et al., 2020).

3 | RESULTS

3.1 | Characterization of *Acanthamoeba* EVs isolated from different strains

Based on SEM images, *Acanthamoeba* trophozoites from all strains were able to release EVs (Figure 1a–h). Also, typical acanthopodia were visualized (Figure 1e–h, arrow heads). To confirm EVs shedding in more details, suggestive EVs structures were detected near the cytoplasm or budding from the membrane (Figure 1i,j).

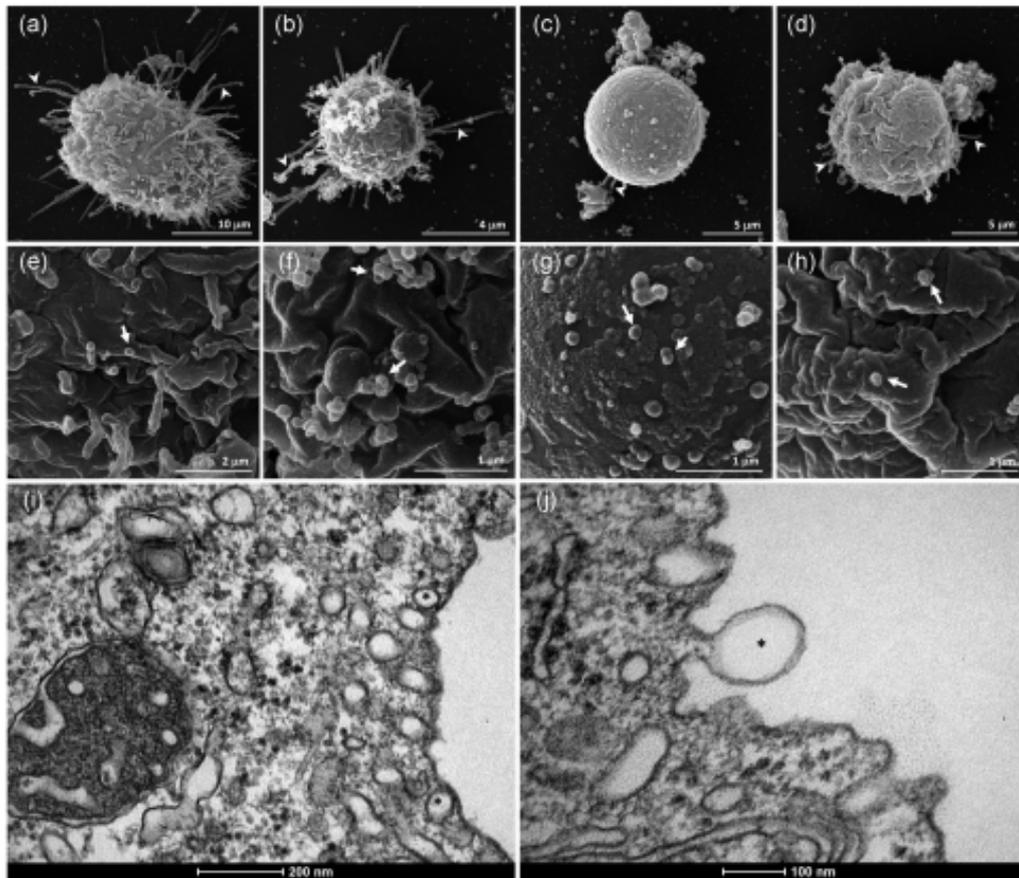


FIGURE 1 Scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) of *Acanthamoeba* trophozoites releasing extracellular vesicles (EVs). The images represent the strains ALX (genotype T4) (a,e,i), R2P5 (genotype T1) (b,f,j), AP4 (genotype T2) (c,g), and AR15 (genotype T11) (d,h). In SEM images (a–h), trophozoites with the typical acanthopodia (arrow heads) showing EVs (arrows) in their surface. In TEM images (i,j), structures suggestive of EVs formation into the cytoplasm or budding from plasma membrane are indicated by asterisks. Scale bars are indicated below the images

To evaluate whether EVs concentration varied among strains, NTA analysis was performed. All cultures maintained their viability above 93% (most with more than 95%), ensuring that the vesicular preparations were obtained from predominantly viable trophozoites (data not shown). NTA analysis showed that EVs purification yielded highly homogeneous preparations (Figure 2a–d), with most of the sizes ranging between 101 and 150 nm (Table 2). The EVs from distinct strains had similar size ranging from 135.3 to 153.2 nm (Figure 2e and Table S1). The concentrations varied from 1.2×10^9 to 8.6×10^{11} particles/ml per batch. However, no significant differences were detected among the averages ($p > .05$; Figure 2f and Table S1). Altogether those data (Figures 1–2) ensure that our EVs preparations were in accordance with the Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018; Théry et al., 2018).

3.2 | *Acanthamoeba* EVs have predominant serine protease activity

EVs from all *Acanthamoeba* strains exhibited gelatinolytic activity at pH 7.4, with identical bands pattern of 100, 59 and 47 kDa (Figure 3, CTRL upper panel). However, more intense activity was seen in samples corresponding to strains ALX and R2P5 (T4 and T1, respectively). At pH 3.5, these two strains exhibited more evident bands of 100 and 59 kDa, whereas a very weak activity of 100 kDa band was detected in samples corresponding to strains AP4 (T2) and AR15 (T11; Figure 3, CTRL lower panel). Proteases activity was totally abrogated by the serine protease inhibitor PMSF in both pHs (Figure 3, PMSF lower and upper panels). EDTA (a metalloprotease inhibitor) and E64 (cysteine protease inhibitor) decreased the sign intensity in bands from T4 and T1 strains,

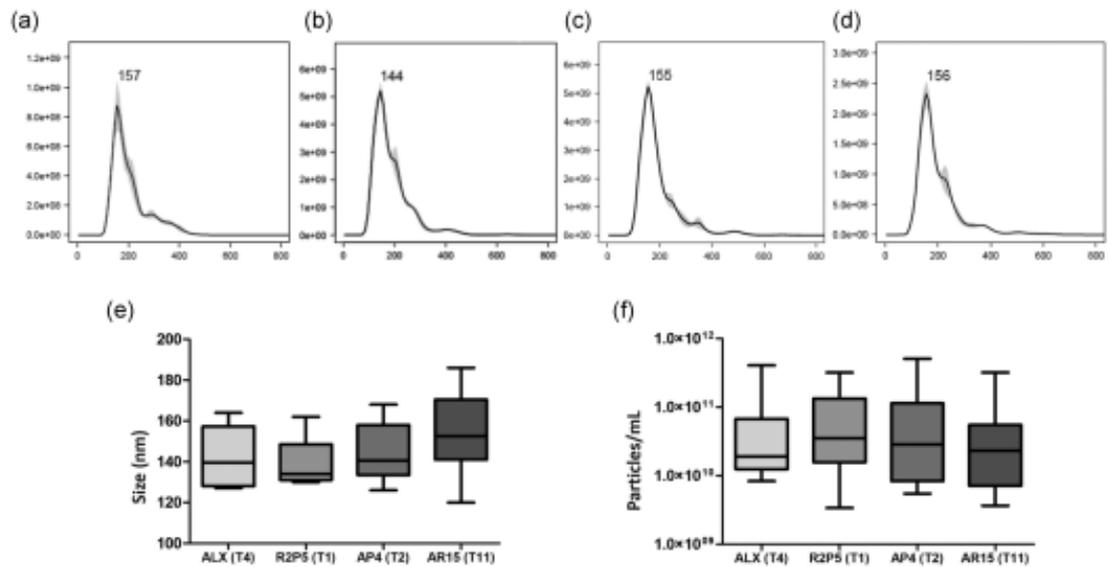


FIGURE 2 EVs size and concentration determined by nanotracking particle analysis (NTA). Graphics representative of an individual experiment (a–d), showing size and concentration profile of EVs from *Acanthamoeba* strains. (a), ALX (genotype T4); (b), R2P5 (genotype T1); (c), AP4 (genotype T2), and (d), AR15 (genotype T11). (e) Size distribution and, (f) Concentration of EVs, representative of 10 independent samples. EV, extracellular vesicles

TABLE 2 Size distribution (%) of extracellular vesicles from different *Acanthamoeba* strains

Size (nm)	ALX (T4)	R2P5 (T1)	AP4 (T2)	AR15 (T11)
51–100	0%	2%	0%	0%
101–150	94.6%	92.4%	96.0%	95.1%
151–200	5.4%	5.6%	4.0%	4.9%
201–250	0%	0%	0%	0%

compared to untreated controls in both pHs (Figure 3, EDTA and E64 lower and upper panels). Also, an impairment of the 47 kDa protease activity by those inhibitors was noticed in EVs from all strains at pH 7.4 (Figure 3, EDTA and E64, upper panels). These inhibitors did not affect substantially proteases profile of T4 and T1 strains at pH 3.5, however, a 100 kDa band became evident in T2 and T11 EVs samples (100 kDa; Figure 3, EDTA and E64, lower panels).

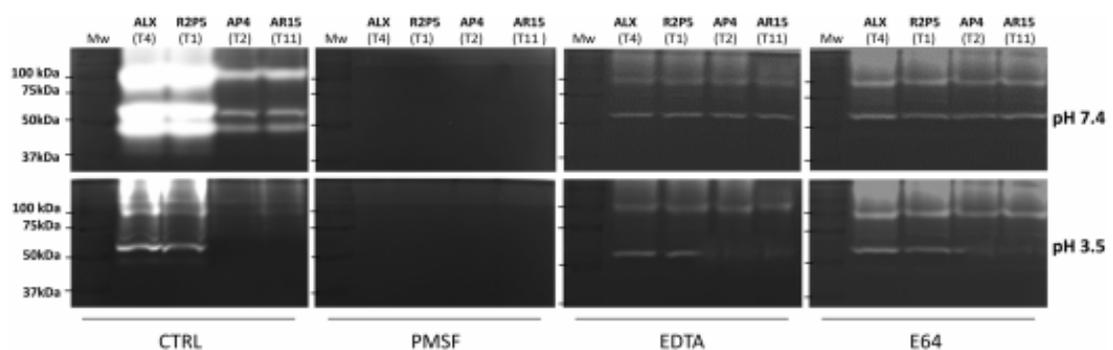


FIGURE 3 Proteases activities of EVs from different *Acanthamoeba* strains (ALX, R2P5, AP4, and AR15, from genotypes T4, T2, T11, and T1, respectively). Zymography assays (10% SDS-PAGE with 1% gelatin) were performed to evaluate proteases activity at pH 7.4 and 3.5. CTRL: samples without inhibitors. PMSF, EDTA, E64 are serine-, metallo- and cysteine protease inhibitors, respectively. Mw, molecular weight marker (Precision Plus Protein™, Kaleidoscope). EDTA, ethylene diamine tetra acetic acid; EV, extracellular vesicles; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

3.3 | EVs from nonpathogenic and pathogenic strains differentially activated murine macrophages

The functional role of EVs in activating peritoneal macrophages from different mice lineages was assessed. A similar activation profile was observed in BALB/c and C57BL/6 macrophages where AR15 strain (T11) induced a higher NO production than the other strains (Figure 4a). In C57BL/6 WT and knockouts, all EVs were

able to induce variable levels of NO via TLR4 and secondarily via TLR2 (Figure 4a). As expected, LPS (TLR4 control) and *S. aureus* (TLR2 control) induced higher levels of NO via TLR2 (-/-) and TLR4 (-/-) macrophages, respectively. Since EVs from *Acanthamoeba* induced NO via TLR4/TLR2, the same supernatants were tested for TNF- α and IL-6 production only in WT mice (BALB/c and C57BL/6). Like NO, a higher production of TNF- α and IL-6 was detected for AR15 strain compared to ALX, R2P5, and AP4 (Figure 4b,c).

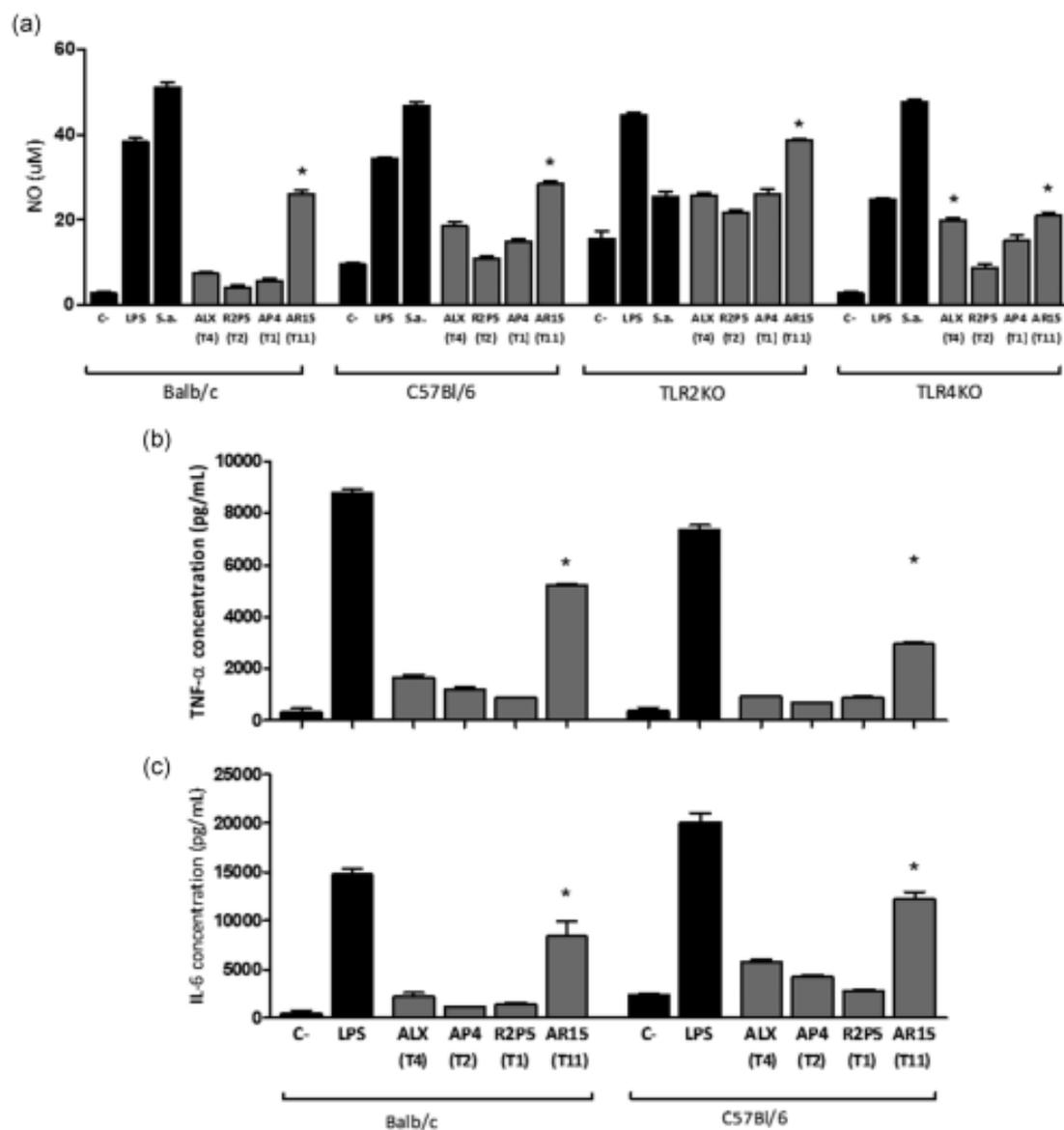


FIGURE 4 NO (a), TNF- α (b) and IL-6 (c) production by IFN- γ primed murine macrophages stimulated with EVs from *Acanthamoeba* strains (ALX, R2P5, AP4, and AR15, from genotypes T4, T2, T11, and T1, respectively). Supernatants for NO, TNF- α , and IL-6 measurements were collected after 48 h of EVs interaction with macrophages from BALB/c and C57BL/6 and respective knockouts (TLR2KO and TLR4KO). Nitrite concentration was measured by Griess reaction. TNF- α and IL-6 levels were determined by CBA analysis. LPS and *Staphylococcus aureus* (*S. a.*) were used as TLR4 and TLR2 controls, respectively. Asterisks indicate statistical differences ($p < .05$). IFN- γ , interferon- γ ; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; NO, nitrite concentration; TNF- α , tumor necrosis factor alpha

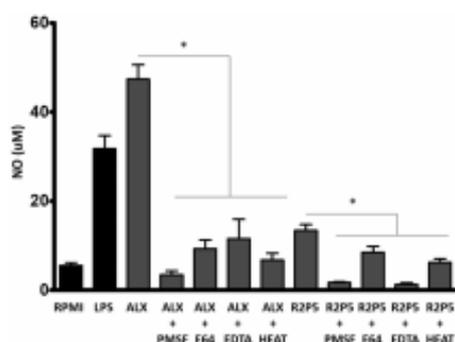


FIGURE 5 NO production by *Acanthamoeba* EVs preexposed to different protease inhibitors and heating. EVs were subjected to protease inhibitors and heating before macrophage exposure. Supernatants were collected after 48 h of EVs interaction with macrophages from C57BL/6. Nitrite concentration was measured by Griess reaction. LPS (positive control) and RPMI (negative control) were used. Asterisks indicate statistical differences ($p < .05$). EV, extracellular vesicles; LPS, lipopolysaccharide; NO, nitrite concentration

3.4 | NO production of *Acanthamoeba* EVs is dependent on proteases integrity

Macrophages exposed to EVs pretreated with protease inhibitors decreased NO production in pathogenic strains (ALX and R2P5; Figure 5). For ALX strain, this decrease was more evident for EVs preincubated with PMSF in comparison with EDTA, E64 and heat. For R2P5, preincubation with PMSF/EDTA drastically decreased NO production. Heat and E63 also decreased NO production in a lesser extent. A fully description of proteases, NO and cytokines among the strains is depicted in Table S1.

4 | DISCUSSION

In the last years, studies have demonstrated the release of EVs by pathogenic protozoan and that these vesicles can act crucially in mechanisms of invasion and host immunomodulation (Mantel & Marti, 2014; Soares et al., 2017; Torrecilhas et al., 2012; Twu et al., 2013). EVs are also released by *Acanthamoeba* trophozoites and their possible involvement with contact-independent mechanism of pathogenicity was recently shown (Gonçalves et al., 2018; Lin et al., 2019; Retana-Moreira et al., 2020).

In the present study, four genotypically distinct strains of *Acanthamoeba* were evaluated with respect to EVs release, proteases and functional ability during interaction with murine macrophages. Based on the microscopy studies (SEM and TEM), those strains successfully released EVs under the conditions of our experiments. Previous studies have shown that the sizes of *Acanthamoeba* EVs may range from 111.3 to 166.7 nm (Gonçalves et al., 2018; Lin et al., 2019; Retana-Moreira et al., 2020). Consistent with those observations, *Acanthamoeba*-derived EVs exhibited a homogeneous profile,

with more than 92% of particles found in the expected range from 100 to 200 nm (average size of 137.2 ± 14.7 nm). Regardless the genotype, no significant differences were detected among the four strains. Similarly, the number of particles did not differ among the four *Acanthamoeba* strains. This is different from *T. cruzi*, in which strains belonging to different discrete typing units released variable amounts of EVs (Nogueira et al., 2015). In *Acanthamoeba*, it is likely that EVs size and concentration are independent of the genotype or strain.

It is already known that proteases are constitutively produced by both pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. They are important to either free-living organisms that must feed on bacteria or to parasitic trophozoites during invasion (Khan, 2006; Magliano et al., 2009), and are also involved in *Acanthamoeba* encystation process, specially cysteine proteases (Wang et al., 2020). Most proteases' studies were performed in *Acanthamoeba* trophozoites and only recently they were found as part of EVs cargo (Gonçalves et al., 2018; Lin et al., 2019; Retana-Moreira et al., 2020). Confirming those findings, we also detected proteases activities in the EVs from the four strains at pH 7.4 and 3.5. This confirms the strong potential of proteases from *Acanthamoeba* to function even in acidic nonphysiological conditions. After inhibition with PMSF, a complete abrogation of enzymatic activity at both pHs indicated serine protease as the main enzymatic entity in *Acanthamoeba* EVs. However, after EDTA/E64 incubation, the intensity of bands decreased in relation to untreated control. The disappearance of a 47-kDa band also indicated the existence of cysteine and metalloproteases in the EVs cargo. These findings corroborate previous studies that showed predominance of serine proteases and the presence in lower amount of metallo- and cysteine proteases in *Acanthamoeba*, either in conditioned medium (Alsam et al., 2005; Cirelli et al., 2020; Khan, 2006; Serrano-Luna et al., 2006; Sissons et al., 2005; Ramirez-Rico et al., 2015), or in EVs (Gonçalves et al., 2018; Retana-Moreira et al., 2020).

In theory, variation in secretoma of distinct *Acanthamoeba* strains could reflect variations in their virulence. This has been suggested in studies relating higher activity of excreted proteases in pathogenic strains compared to nonpathogenic (Cirelli et al., 2020; Khan et al., 2000). However, the investigations addressing proteases activity in EVs cargo have used only a single strain (Gonçalves et al., 2018; Lin et al., 2019; Retana-Moreira et al., 2020), reinforcing the need of expanding the number of isolates for comparison. Comparing four strains, we found higher proteolytic activity in EVs from ALX (T4) and R2P5 (T1) strains. ALX can be considered a pathogenic strain due to its clinical origin (AK case) and tolerance to high temperature and osmolarity (42°C and 1 M; Duarte et al., 2013). Although from environmental origin, R2P5 is characterized as pathogenic: (1) it tolerates 40°C and exerts cytopathogenicity to MDCK cells (Possamai et al., 2018), (2) it is classified as T1, an genotype eventually associated to GAE (Alsam et al., 2005; Sissons et al., 2006), (3) it secretes higher amounts of proteases than other *Acanthamoeba*, including some AK-derived T4 strains (Cirelli et al., 2020). On the other hand, AR15 (genotype T11) is an environmental

strain considered non-pathogenic by some phenotypic parameters (Duarte et al., 2013). AP4 (genotype T2), in turn, is a freshwater isolate with milder pathogenic potential, since it exhibited features of low pathogenicity in a study (Da Rocha-Azevedo & Costa e Silva-Filho, 2007), but it could experimentally induce pulmonary disease in rats (Veríssimo et al., 2013). Considering these aspects, the higher proteases activities in ALX and R2P5 indicated that EVs may in part affect the pathogenicity expression of *Acanthamoeba*. Recently, serine and cysteine proteases were shown to be involved in cytokine induction and PAR₁ activation in murine macrophages (Cano et al., 2019). In this context, our next step was to evaluate the role of EVs bearing different enzymatic profiles in the innate immune compartment.

It is known that EVs shed by other parasites express molecules that exert a crucial role in immunomodulatory mechanisms (Barbosa et al., 2018; Nogueira et al., 2020; Ribeiro et al., 2018; Torrecilhas et al., 2012). In *Acanthamoeba*, most of the previous studies have focused on interaction with trophozoites showing the induction of several components of innate immune compartment including TLRs, cytokines and nuclear factors (Cano et al., 2017; Derda et al., 2016; Ren & Wu, 2011; Ren et al., 2010; Wojtkowiak-Giera et al., 2016). In those studies, it was evident the participation of TLR4 and TLR2 as the receptor recognizing *Acanthamoeba*. Here, using murine macrophages and respective knockouts, we confirmed TLR4 as the major receptor for *Acanthamoeba* EVs and secondarily TLR2. It indicates that EVs by carrying different types of PAMPs are important for innate immune activating during host-pathogen interactions in acanthamoebiasis.

EVs from an *A. castellanii* strain were shown to stimulate human THP-1 cells to produce proinflammatory cytokines including IL-6 and IL-12 (Lin et al., 2019). Here, EVs could induce NO, TNF- α and IL-6 and this ability varied among strains. EVs from the environmental strain AR15 exhibited a high proinflammatory profile compared to the other samples. Alike other protozoa, these findings reinforce that *Acanthamoeba* EVs have immunomodulatory properties depending on the strain. EVs from parasitic protozoa are covered with a wide range of molecules and proteomic analysis may help to elucidate intraspecies variation and pathogenicity. For instance, *T. cruzi* EVs from distinct strains show differences in α -Galactosyl epitopes and protein amount, resulting in differential modulation of early and later events of immune responses (Nogueira et al., 2015). For *Acanthamoeba*, the mechanisms underlying differential macrophage activation by EVs are in its infancy. Based on our findings, it is very clear the role of proteases on NO production. In the pathogenic strains (ALX and R2P5), inhibition of proteases corroborated with the zymograms and was predominantly dependent on serine proteases and in a lesser extent metallo- and cysteine proteases. Both are pathogenic, so other factors may be working together and are perhaps, strain specific. It is very clear that the ability to trigger NO and cytokines was higher in AR15 and we could postulate this would be involved in their recognition and early destruction by the innate immune system. It is important to reinforce that within the limitation of

our in vitro experiments, that this phenomenon is multifactorial and dependent on in vivo experiments to better understand the factors underlying *Acanthamoeba* pathogenesis. Other key elements of the innate immune pathways such as MAPKs and NF-KB translocation will help to elucidate these aspects. Nevertheless, it is noteworthy that EVs from the strain with low pathogenicity (AR15) and belonging to a genotype less likely to cause infection (T11) have demonstrated a higher proinflammatory profile. Similarly, murine bone marrow-derived macrophages cocultured with a laboratorial, low pathogenicity strain of *Acanthamoeba* induced higher levels of IL-12 and IL-6 than a clinical isolate (Cano et al., 2017). Altogether, these findings are consistent with the idea that non-pathogenic *Acanthamoeba* could induce a proinflammatory activation of the innate immune compartment, resulting in its killing during the initial steps of infection. Conversely, infectivity of pathogenic strains could be related to a low cytokine production, contributing to the persistence in the host. Further studies with a broader panel of immunological markers and involving more strains could confirm this hypothesis.

5 | CONCLUSION

Our findings indicated that *Acanthamoeba* EVs exhibit immunomodulatory effects that vary depending on the strain. Also, for two pathogenic strains (ALX and R2P5), a correlation between proteases and NO induction was detected. Functionally, EVs were able to immunomodulate NO, IL-6, and TNF- α production by murine macrophages. A more detailed analysis of their cargo and the inclusion of more strains will help to ascertain other factors involved in *Acanthamoeba* pathogenicity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author thank the Centers of Microscopy at the Federal University of Minas Gerais (UFMG; <http://www.microscopia.ufmg.br>) and Federal University of Sao Paulo CEME UNIFESP for microscopy procedures. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (APQ-01100-14 and PPM-X 00102-16), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (302972/2019-6, 302104/2019-4 and 405336/2017-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (AUXPE 1526/2011) and Fundação de Amparo do Estado de São Paulo (2016-01917-3).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Adriana Oliveira Costa, Ana Claudia Torrecilhas, Rodrigo Pedro Soares, Armando de Menezes-Neto, Blima Fux, and Cinthia Furst conceived and designed the study, contributed to the data analysis, and drafted and revised the manuscript. Isabela Aurora Rodrigues Chagas, Ana Claudia Torrecilhas, Armando de Menezes-Neto, and Paula Monalisa Nogueira performed the experiments. All authors read and approved the final version of this manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Rodrigo Pedro Soares  <http://orcid.org/0000-0002-7966-3629>

REFERENCES

- Alfieri, S. C., Correia, C. E., Motegi, S. A., & Pral, E. M. (2000). Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Journal of Parasitology*, 86, 220–227. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0220:PAITEA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0220:PAITEA]2.0.CO;2)
- Alsam, S., Sissons, J., Jayasekera, S., & Khan, N. A. (2005). Extracellular proteases of *Acanthamoeba castellanii* (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increased permeability in an in vitro model of the human blood–brain barrier. *Journal of Infection*, 51, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.09.001>
- Atayde, V. D., Hassani, K., da Silva Lira Filho, A., Borges, A. R., Adhikari, A., Martel, C., & Olivier, M. (2016). *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. *Cellular Immunology*, 309, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.07.013>
- Barbosa, F. M. C., Dupin, T. V., Toledo, M. S., Reis, N. F. C., Ribeiro, K., Cronemberger-Andrade, A., Rugani, J. N., De Lorenzo, B. H. P., Novaes e Brito, R. R., Soares, R. P., Torrecilhas, A. C., & Xander, P. (2018). Extracellular vesicles released by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promote disease progression and induce the production of different cytokines in macrophages and B-1 Cells. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03056>
- Brown, A. C., Ross, J., Jones, D. B., Collier, S. A., Ayers, T. L., Hoekstra, R. M., & Yoder, J. S. (2017). Risk factors for *Acanthamoeba* Keratitis—A Multistate Case–control study, 2008–2011. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*, 44, S173–S178. <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000365>
- Campos, J. H., Soares, R. P., Ribeiro, K., Andrade, A. C., Batista, W. L., & Torrecilhas, A. C. (2015). Extracellular vesicles: Role in inflammatory responses and potential uses in vaccination in cancer and infectious diseases. *Journal of Immunology Research*, 2015, 832057. <https://doi.org/10.1155/2015/832057>
- Cano, A., Mattana, A., Henriquez, F. L., Alexander, J., & Roberts, C. W. (2019). *Acanthamoeba* proteases contribute to macrophage activation through PAR₁, but not PAR₂. *Parasite Immunology*, 41, e12612. <https://doi.org/10.1111/pim.12612>
- Cano, A., Mattana, A., Woods, S., Henriquez, F. L., Alexander, J., & Roberts, C. W. (2017). *Acanthamoeba* activates macrophages predominantly through toll-like receptor 4- and MyD88-dependent mechanisms to induce interleukin-12 (IL-12) and IL-6. *Infection and Immunity*, 85, e01054–16. <https://doi.org/10.1128/IAI.01054-16>
- Chomicz, L., Padzik, M., Graczyk, Z., Starosciak, B., Graczyk, T. K., Naprawska, A., Oledzka, G., & Szostakowska, B. (2010). *Acanthamoeba castellanii*: in vitro effects of selected biological, physical and chemical factors. *Experimental Parasitology*, 126, 103–105. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.01.025>
- Cirelli, C., Mesquita, E. I. S., Chagas, I. A. R., Furst, C., Possamai, C. O., Abrahão, J. S., Dos Santos Silva, L. K., Grossi, M. F., Tagliati, C. A., & Costa, A. O. (2020). Extracellular protease profile of *Acanthamoeba* after prolonged axenic culture and after interaction with MDCK cells. *Parasitology Research*, 119(2), 659–666. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06562-w>
- Clarke, D. W., Alizadeh, H., & Niederkorn, J. Y. (2006). Intracorneal instillation of latex beads induces macrophage-dependent protection against *Acanthamoeba* keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47, 4917–4925. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0266>
- Da Rocha-Azevedo, B., & Costa e Silva-Filho, F. (2007). Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga*: Analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. *Archives in Microbiology*, 188, 441–449. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0264-3>
- Derda, M., Wojtkowiak-Giera, A., Kolasa-Wolosiuk, A., Kosik-Bogacka, D., Hadaś, E., Jagodziński, P. P., & Wandurska-Nowak, E. (2016). *Acanthamoeba* infection in lungs of mice expressed by toll-like receptors (TLR2 and TLR4). *Experimental Parasitology*, 165, 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.02.012>
- Duarte, J. L., Furst, C., Klisiowicz, D. R., Klassen, G., & Costa, A. O. (2013). Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. *Experimental Parasitology*, 135, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.013>
- Fuerst, P. A., Booton, G. C., & Crary, M. (2015). Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62, 69–84. <https://doi.org/10.1111/jeu.12186>
- Gonçalves, D. S., Ferreira, M. S., Liedke, S. C., Gomes, K. X., de Oliveira, G. A., Leão, P. E. L., Cesar, G. V., Seabra, S. H., Cortines, J. R., Casadevall, A., Nimrichter, L., Domont, G. B., Junqueira, M. R., Peralta, J. M., & Guimaraes, A. J. (2018). Extracellular vesicles and vesicle-free secretome of the protozoa *Acanthamoeba castellanii* under homeostasis and nutritional stress and their damaging potential to host cells. *Virulence*, 9, 818–836. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1451184>
- Kalra, S. K., Sharma, P., Shyam, K., Tejan, N., & Ghoshal, U. (2020). *Acanthamoeba* and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis. *Experimental Parasitology*, 208, 107788. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107788>
- Khan, N. A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 564–595. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x>
- Khan, N. A., Jarroll, E. L., Panjwani, N., Cao, Z., & Paget, T. A. (2000). Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2858–2861.
- Kot, K., Kosik-Bogacka, D., Łanocha-Arendarczyk, N., Wojtkowiak-Giera, A., & Kolasa-Wolosiuk, A. (2019). Expression of toll-like receptors (TLR2 and TLR4) in the eyes of mice with disseminated acanthamoebiasis. *BioMed Research International*, 2019, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2019/1401894>
- Lin, W. C., Tsai, C. Y., Huang, J. M., Wu, S. R., Chu, L. J., & Huang, K. Y. (2019). Quantitative proteomic analysis and functional characterization of *Acanthamoeba castellanii* exosome-like vesicles. *Parasites & Vectors*, 12, 467. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3725-z>
- Lorenzo-Morales, J., Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Piñero, J. E., & Valladares, B. (2013). *Acanthamoeba* keratitis: An emerging disease gathering importance worldwide? *Trends in Parasitology*, 29, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.01.006>
- Maciver, S. K., Asif, M., Simmen, M. W., & Lorenzo-Morales, J. (2013). A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. *European Journal of Protistology*, 49, 217–221. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2012.11.004>
- Magliano, A. C., da Silva, F. M., Teixeira, M. M., & Alfieri, S. C. (2009). Genotyping, physiological features and proteolytic activities of potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. Isolated from tap water in

- Brazil. *Experimental Parasitology*, 123, 231–235. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.07.006>
- Mantel, P. Y., & Marti, M. (2014). The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. *Cell Microbiology*, 16, 344–354. <https://doi.org/10.1111/cmi.12259>
- Marciano-Cabral, F., & Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 273–307. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.273-307.2003>
- Neelam, S., & Niederkorn, J. Y. (2017). Pathobiology and Immunobiology of *Acanthamoeba* Keratitis: Insights from Animal Models. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 23, 261–268.
- Nogueira, P. M., De menezes-Neto, A., Borges, V. M., Descoteaux, A., Torrecilhas, A. C., Xander, P., Revach, O. Y., Regev-Rudski, N., & Soares, R. P. (2020). Immunomodulatory properties of *Leishmania* extracellular vesicles during host-parasite interaction: Differential activation of TLRs and NF- κ B translocation by dermatropic and viscerotropic species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 380. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00380>
- Nogueira, P. M., Ribeiro, K., Silveira, A. C. O., Campos, J. H., Martins-Filho, O. A., Bela, S. R., Campos, M. A., Pessoa, N. L., Colli, W., Alves, M. J. M., Soares, R. P., & Torrecilhas, A. C. (2015). Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 28734. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28734>
- Possamai, C. O., Loss, A. C., Costa, A. O., Falqueto, A., & Furst, C. (2018). *Acanthamoeba* of three morphological groups and distinct genotypes exhibit variable and weakly inter-related physiological properties. *Parasitology Research*, 117, 1389–1400. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5824-8>
- Ramirez-Rico, G., Martínez-Castillo, M., de la Garza, M., Shibayama, M., & Serrano-Luna, J. (2015). *Acanthamoeba castellanii* proteases are capable of degrading iron-binding proteins as a possible mechanism of pathogenicity. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(5), 614–622. <https://doi.org/10.1111/jeu.12215>
- Randag, A. C., van Rooij, J., van Goor, A. T., Verkerk, S., Wisse, R. P. L., Saelens, I. E. Y., Stoutenbeek, R., van Dooren, B. T. H., Cheng, Y. Y. Y., & Eggink, C. A. (2019). The rising incidence of *Acanthamoeba* keratitis: A 7-year nationwide survey and clinical assessment of risk factors and functional outcomes. *PLoS One*, 14(9), e0222092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222092>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200, 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Ren, M., Gao, L., & Wu, X. (2010). TLR4: The receptor bridging *Acanthamoeba* challenge and intracellular inflammatory responses in human corneal cell lines. *Immunology & Cell Biology*, 88, 529–536. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.6>
- Ren, M. Y., & Wu, X. Y. (2011). Toll-like receptor 4 signalling pathway activation in a rat model of *Acanthamoeba* Keratitis. *Parasite Immunology*, 33, 25–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01247.x>
- Retana-Moreira, L., Vargas Ramirez, D., Linares, F., Prescilla Ledezma, A., Vaglio Garro, A., Osuna, A., Lorenzo Morales, J., & Abrahams Sandi, E. (2020). Isolation of *Acanthamoeba* T5 from water: Characterization of its pathogenic potential, including the production of extracellular vesicles. *Pathogens*, 9, 144. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020144>
- Ribeiro, K. S., Vasconcellos, C. I., Soares, R. P., Mendes, M. T., Ellis, C. C., Aguilera-Flores, M., de Almeida, I. C., Schenkman, S., Iwai, L. K., & Torrecilhas, A. C. (2018). Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7, 1463779. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1463779>
- Schuster, F. L., & Visvesvara, G. S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34, 1001–1027. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.004>
- Seal, D. V. (2003). *Acanthamoeba* keratitis up-date incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye*, 17, 893–905. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6700563>
- Serrano-Luna, J. de J., Cervantes-Sandoval, I., Calderón, J., Navarro-García, F., Tsutsumi, V., & Shibayama, M. (2006). Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 16–23. <https://doi.org/10.1139/w05-114>
- Siddiqui, R., & Khan, N. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*, 5, 6. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-6>
- Silverman, J. M., & Reiner, N. E. (2011). *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 1–26. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00026>
- Sissons, J., Alsam, S., Goldsworthy, G., Lightfoot, M., Jarroll, E. L., & Khan, N. A. (2006). Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis. *BMC Microbiology*, 3(6), 42. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-42>
- Soares, R. P., Cardoso, T. L., Barron, T., Araujo, M. S., Pimenta, P. F., & Turco, S. J. (2005). *Leishmania braziliensis*: A novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *International Journal for Parasitology*, 35, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.12.008>
- Soares, R. P., Xander, P., Costa, A. O., Marcilla, A., Menezes Neto, A., Del Portillo, H., Witwer, K., Wauben, M., Nolte-T Hoen, E., Olivier, M., Criado, M. F., da Silva, L. L. P., Abdel Baqui, M. M., Schenkman, S., Colli, W., Alves, M. J. M., Ferreira, K. S., Puccia, R., Nejsun, P., ... Torrecilhas, A. C. (2017). Highlights of the São Paulo ISEV workshop on extracellular vesicles in cross-kingdom communication. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6, 1407213. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1407213>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Jovanovic-Talisman, T. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7, 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*, 2(8), 569–579. <https://doi.org/10.1038/nri855>
- Tkach, M., & Théry, C. (2016). Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go. *Cell*, 164, 1226–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>
- Toledo, M. S., Cronemberger-Andrade, A., Barbosa, F. M. C., Reis, N. F., Dupin, T. V., Soares, R. P., Torrecilhas, A. C., & Xander, P. (2020). Effects of extracellular vesicles released by peritoneal B-1 cells on experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 2020, 1–12. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MA0220-464RR>
- Torrecilhas, A. C., Schumacher, R. I., Alves, M. J., & Colli, W. (2012). Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes and Infection*, 14, 1465–1474. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.07.008>
- Twu, O., de Miguel, N., Lustig, G., Stevens, G. C., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., & Johnson, P. J. (2013). *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host ratio parasite

- interactions. *PLoS Pathogens*, 9, e1003482. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003482>
- Verissimo, C.deM., Maschio, V. J., Correa, A. P., Brandelli, A., & Rott, M. B. (2013). Infection in a rat model reactivates attenuated virulence after long-term axenic culture of *Acanthamoeba* spp. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 832–835. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130099>
- Wang, Z., Wu, D., Tachibana, H., Feng, M., & Cheng, X. (2020). Identification and biochemical characterisation of *Acanthamoeba castellanii* cysteine protease. *Parasites & Vectors*, 13, 592. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04474-8>
- Wojtkowiak-Giera, A., Derda, M., Kolasa-Wołoskiuk, A., Hadaś, E., Kosik-Bogacka, D., Solarczyk, P., & Wandurska-Nowak, E. (2016). Toll-like receptors in the brain of mice following infection with *Acanthamoeba* spp. *Parasitology Research*, 115, 4335–4344. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5217-9>
- Zempleni, J., Aguilar-Lozano, A., Sadri, M., Sukreet, S., Manca, S., Wu, D., Zhou, F., & Mutai, E. (2017). Biological activities of extracellular vesicles and their cargos from bovine and

human milk in humans and implications for infants. *Journal of Nutrition*, 147, 3–10. <https://doi.org/10.3945/jn.116.238949>

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Costa AO, Chagas IAR, Menezes-Neto A, et al. Distinct immunomodulatory properties of extracellular vesicles released by different strains of *Acanthamoeba*. *Cell Biol Int*. 2021;1–12. <https://doi.org/10.1002/cbin.11551>

ANEXO II: Outras publicações produzidas durante o doutorado

Parasitology Research (2020) 119:659–666
<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06562-w>

PROTOZOOLOGY - ORIGINAL PAPER



Extracellular protease profile of *Acanthamoeba* after prolonged axenic culture and after interaction with MDCK cells

Cecília Cirelli¹ · Elaine Isabela Soares Mesquita¹ · Isabela Aurora Rodrigues Chagas¹ · Cinthia Furst² · Cynara Oliveira Possamai² · Jonatas Santos Abrahão³ · Ludmila Karen dos Santos Silva³ · Marina Felipe Grossi¹ · Carlos Alberto Tagliati¹ · Adriana Oliveira Costa¹

Received: 3 September 2019 / Accepted: 19 November 2019 / Published online: 17 December 2019
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba* are causative agents of *Acanthamoeba* keratitis and amoebic encephalitis in humans, both of which are serious infections. The ability to produce proteases is one of the factors involved in the pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. The aim of this study was to evaluate the secreted proteases of six *Acanthamoeba* strains from distinct genotypes (T1, T2, T4 and T11) maintained in prolonged axenic culture and following three successive passages in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells. Conditioned medium was obtained from cultures before and after interaction with the MDCK monolayers, resolved in SDS-PAGE containing gelatine, then subjected to quantitative azocasein assays. Zymography profiles varied between the strains, with the predominant proteases found to be serine-type proteases from 49 to 128 kDa. A T1 genotype strain isolated from dust showed quantitatively higher protease secretion compared to the other strains. No changes were detected in the zymography profiles of MDCK-interacted cultures compared to long-term axenic cultures. Two strains presented lower proteolytic activity post-MDCK interaction, while the remaining strains presented similar values before and after MDCK passages. In conclusion, this study confirms the predominance of serine-type protease secretion by *Acanthamoeba*, with distinct profiles presented by the different strains and genotypes studied. Also, interaction of trophozoites with MDCK cells did not alter the zymography pattern.

Keywords *Acanthamoeba* · Genotype · MDCK interaction · Pathogenicity · Protease

Introduction

Amoebae of the genus *Acanthamoeba* are free-living organisms that are ubiquitously distributed in nature and are therefore in frequent contact with humans. In most cases this contact is innocuous; however, *Acanthamoeba* species can cause potentially blinding or fatal infections. A painful, progressive

corneal disease caused by this protozoan, known as *Acanthamoeba* keratitis (AK), is generally associated with contact lens use, usually due to poor hygiene or exposure to amoebas while swimming or showering while wearing contact lenses (Page and Mathers 2013). Other clinical presentations of acanthamoebiasis include skin lesions and lung infections that progress to involvement of the central nervous system, culminating in granulomatous amoebic encephalitis (GAE). GAE is a severe disease with a high mortality rate (higher than 90%) that occurs predominantly in patients presenting chronic or immunosuppressive diseases (Khan 2009; Marciano-Cabral and Cabral 2003).

Proteases are considered an important virulence factor of many pathogens, including *Acanthamoeba* (Khan 2006). Adhesion to host cells through glycoprotein-lectin interactions constitutes the first step in AK, which is followed by protease secretion and a subsequent cytopathic effect (Hurt et al. 2003; Clarke and Niederkorn 2006). In GAE, proteases play an important role in the disruption of the blood-

Handling Editor: Julia Walochnik

✉ Adriana Oliveira Costa
adrincosta@gmail.com

¹ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

² Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

³ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil



ORIGINAL ARTICLE

Acanthamoeba castellanii as an alternative interaction model for the dermatophyte *Trichophyton rubrum*

Lucas V. de Faria¹ | Paulo H. F. do Carmo¹ | Marliete C. da Costa¹ | Nalu T. A. Peres¹ |
 Isabela A. Rodrigues Chagas² | Cinthia Furst³ | Gabriella F. Ferreira⁴ |
 Adriana O. Costa² | Daniel A. Santos¹

¹Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

³Departamento de Patologia, Centro Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil

⁴Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Juiz de Fora, Governador Valadares, Brazil

Correspondence

Daniel A. Santos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, PO Box 486, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. Email: das@ufmg.br or dasufmg@gmail.com

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: 1526/2011; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 302670/2017-3 and 403006/2016-3; Ministério da Saúde, Grant/Award Number: 440010/2018-7; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Grant/Award Number: PPM-00061-18

Summary

Background: *Trichophyton rubrum* (Tr) is the main aetiological agent of human dermatophytosis, being isolated from the environment and keratinised tissues. In the environment, Tr can interact with other organisms, such as free-living amoebas (FLA), which can act as an alternative host system to study the interaction between microbes and phagocytic cells.

Objectives: To characterise the *Acanthamoeba castellanii* (ALX)-Tr interaction.

Methods: Interaction was characterised in three conditions: trophozoites (PYG), late (PYG/NES) and early (NES) encystation stimulus, evaluating encystation kinetics, phagocytosis, exocytosis and fungicidal activity dynamics.

Results: Tr was able to induce ALX encystation and be internalised by ALX. The number of internalised conidia was high at 1 hour, and ALX presented fungicidal activity with increased intracellular ROS production and exocytosis. In PYG/NES, phagocytosis and ROS production were reduced, with decreased ALX's fungicidal activity. However, in NES there was an increased fungal engulfment, and a reduced ROS production and higher fungal burden. Furthermore, exogenous mannose decreased phagocytosis of Tr conidia, and divalent cations induced ROS production and increased ALX's fungicidal activity. Interestingly, phagocytosis was reduced in the presence of cytoskeleton inhibitor, but exocytosis was increased, suggesting that Tr conidia may have alternative pathways to escape ALX's cells.

Conclusion: *A. castellanii* is a proper model for studying Tr-FLA interaction, since ALX can engulf, produce ROS and kill Tr, and all these parameters are influenced by an encystation stimulus and divalent cations. Moreover, this interaction is likely to occur in the environment implicating in the adaptation to environmental stressful conditions in both organisms.

KEYWORDS

Acanthamoeba castellanii, dermatophyte, fungal-host interaction, infection model, pathogenicity, phagocytosis, *Trichophyton rubrum*, virulence



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Differential expression of *Acanthamoeba castellanii* proteins during amoebic keratitis in rats

Ana Carolina Carvalho-Silva^a, Camila H. Coelho^b, Cecília Cirelli^a, Frederico Crepaldi^a,
Isabela Aurora Rodrigues-Chagas^a, Cinthia Furst^c, Daniel Carvalho Pimenta^d,
Juliano Simões de Toledo^a, Ana Paula Fernandes^a, Adriana Oliveira Costa^{a,*}

^a Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Laboratory of Malaria Immunology and Vaccinology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

^c Department of Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

^d Biochemistry and Biophysics Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Acanthamoeba
Amoebic keratitis rat model
Proteomics

ABSTRACT

Amoebic keratitis (AK) is a sight-threatening infection characterized by a severe inflammation of the cornea, caused by the free-living protozoan of the genus *Acanthamoeba*. Identification of amoebic proteins involved in AK pathogenesis may help to elucidate molecular mechanisms of infection and contribute to indicate diagnostic and therapeutic targets. In this study, we evaluated changes in the expression profile of *Acanthamoeba* proteins triggered by the invasive process, using an approach involving two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2DE PAGE), followed by mass spectrometry identification (ESI-IT-TOF LC-MSn). AK was induced by intrastromal inoculation in Wistar rats, using trophozoites from a T4 genotype, human case-derived *A. castellanii* strain under prolonged axenic culture. Cultures re-isolated from the lesions after two successive passages in the animals were used as biological triplicate for proteomic experiments. Analysis of the protein profile comparing long-term and re-isolated cultures indicated 62 significant spots, from which 27 proteins could be identified in the *Acanthamoeba* proteome database. Five of them (Serpin, Carboxypeptidase A1, Hypothetical protein, Calponin domain-containing protein, aldo/keto reductase) were exclusively found in the re-isolated trophozoites. Our analysis also revealed that a concerted modulation of several biochemical pathways is triggered when *A. castellanii* switches from a free-living style to a parasitic mode, including energetic metabolism, proteolytic activity, control of gene expression, protein degradation and methylation of DNA, which may be also involved in gain of virulence in an animal model of AK.

1. Introduction

Amoebae are a group of widely diverse protozoa that includes some species capable of living primarily as free-living organisms and eventually as parasites (Visvesvara et al., 2007). Among such amphizoic amoeba, the most frequently found in the environment are those belonging to genus *Acanthamoeba* (Siddiqui et al., 2012).

Acanthamoeba species evoke clinical interest because they can cause two main severe infections in humans: granulomatous amoebic encephalitis (GAE) and amoebic keratitis (AK). GAE is a rare central nervous system (CNS) infection with more than 90% of lethality and predominantly associated with immunocompromised patients (Kalra

et al., 2020; Siddiqui et al., 2012). AK is a sight-threatening infection of the cornea whose number of cases has been increasing in the last decades. Contact lenses users are considered the main risk group for developing AK, because of the susceptibility of the lens and other accessories to contamination and the occurrence of corneal micro-traumas predisposing to infection (Neelam and Niederkorn, 2017; Siddiqui et al., 2012). In many situations, the similarity of AK to another microbial keratitis delays the diagnosis, resulting in poor response to treatment and, sometimes, demanding corneal transplantation (Lorenzo-Morales et al., 2015; Siddiqui et al., 2012).

Interaction between human hosts and *Acanthamoeba* is a frequent event. The eventual parasitic behavior of *Acanthamoeba* depends on

* Corresponding author. Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.

E-mail address: adrincosta@gmail.com (A.O. Costa).

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108060>

Received 1 April 2020; Received in revised form 4 November 2020; Accepted 13 December 2020

Available online 15 December 2020

0014-4894/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.