

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

**ELAINE ISABELLA SOARES MESQUITA**

**PROTEASES SECRETADAS POR AMOSTRAS CLÍNICAS E  
AMBIENTAIS DE *Acanthamoeba* DE DIFERENTES  
GENÓTIPOS**

Belo Horizonte

2015

**ELAINE ISABELLA SOARES MESQUITA**

**PROTEASES SECRETADAS POR AMOSTRAS CLÍNICAS E  
AMBIENTAIS DE *Acanthamoeba* DE DIFERENTES  
GENÓTIPOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Oliveira Costa UFMG

Belo Horizonte

2015



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



## FOLHA DE APROVAÇÃO

### **PROTEASES SECRETADAS POR AMOSTRAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS DE *Acanthamoeba* DE DIFERENTES GENÓTIPOS**

**ELAINE ISABELLA SOARES MESQUITA**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 29 de dezembro de 2015, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Adriana Oliveira Costa - Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Cristiane Alves da Silva Menezes  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Cinthia Furst Leory Gomes Bueloni  
Universidade Federal do Espírito Santo

Belo Horizonte, 29 de dezembro de 2015.

## AGRADECIMENTO

É durante a realização de um trabalho que sentimos a necessidade de ter amigos que nos auxiliem, nos guiem e nos orientem. Aqui, expresso minha gratidão:

À Deus, que foi minha fortaleza, e por ter me mantido de pé com uma força que eu não sabia que tinha.

À Nossa Senhora das Graças, que me guardou e iluminou nas madrugadas de escrita.

À minha família, que lutou junto de mim para que esse sonho se realizasse, à minha avó Zezé que me ensinou a ter sonhos, minha mãe Ângela que é meu exemplo de guerreira, meu pai Demosténes que era um presente na minha vida, meus irmãos Glauco e Otávio, cunhadas Bárbara e Priscila, e sobrinhas Maria Luiza e Ana Carolina que alegam os meus dias, minha tia Eliana e meu primo Otávio pela admiração e amor, e meu cachorro Pitico pela parceria nas madrugadas.

À minha amiga Tamara, por ter vivido a experiência do mestrado comigo e por compartilhar alegrias e angústias ao longo desses anos.

Às minhas amigas, Laura, Larissa e Marianne, que sempre estiveram comigo e apoiaram as minhas escolhas.

Aos meus amigos do Laboratório Hermes Pardini, que cuidaram de mim com muito carinho, me ampararam e incentivaram muito ao longo dessa jornada dupla.

À minha orientadora Professora Dra. Adriana, por tudo o que me ensinou, me corrigiu e me orientou.

À Cecília e Marina, pela ajuda na execução dos experimentos e pela companhia.

Ao Professor Vicente e à aluna Marcela, do Laboratório de Imunologia – Fafar, pela compreensão e apoio.

Às Professoras Lirlândia e Ana Paula e aos alunos Michele e Juliano, do Laboratório de Biologia Molecular – Fafar, pelo auxílio com materiais, protocolos e equipamentos.

Ao Professor Jônatas Abrahão e à aluna Ludmila, do Laboratório de Vírus, ICB – UFMG, pela ajuda na realização dos experimentos de efeito citopático.

Aos técnicos do Laboratório de Parasitologia Beto, Vanda e Leninha, pelo auxílio na manutenção do laboratório.

Enfim, a todos aqueles que me auxiliaram de alguma forma na elaboração desse trabalho e na minha vida, o meu “Muito Obrigada!”

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Classificação dos principais gêneros de amebas de vida livre, segundo Levine e colaboradores (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003 – modificado). 18
- Figura 2:** Classificação dos principais gêneros de amebas de vida livre, segundo ADL e colaboradores, 2012 (ADL et. al., 2012). 20
- Figura 3:** (A) Cisto de *Acanthamoeba* do grupo morfológico I (B) Cisto de *Acanthamoeba* do grupo morfológico II (C) Cisto de *Acanthamoeba* do grupo morfológico III (D) Trofozoíto de *Acanthamoeba*. Nos cistos é possível visualizar o ectocisto (seta azul) e endocisto (seta vermelha), pela técnica de microscopia de campo claro. No trofozoíto é possível observar acantopódio (seta preta) e vacúolos (\*), visíveis pela microscopia de contraste de fase. Adaptado de LORENZO-MORALES et al., 2015. 22
- Figura 4:** (A) Infiltrado em anel em paciente com CA (KANSKI, 2004). (B) Lesões na córnea de um paciente com CA após a aplicação de fluoresceína de sódio (LORENZO-MORALES et al., 2015). 27
- Figura 5:** Curva de crescimento dos isolados, em cultivo axênico com meio PYG (proteose-peptona extrato de levedo) completo (10% soro bovino fetal e 0,02 mg/mL enrofloxacino), com inóculo inicial de  $10^5$  trofozoítos/mL. 41
- Figura 6:** Efeito citopático dos isolados em monocamada de células MDCK. (A) Controle de célula. (B) isolado ALX. (C) Isolado AP4. (D) Isolado AR14. Aumento de 10x. 42
- Figura 7:** Efeito citopático dos isolados em monocamada de células MDCK. (A) Controle de célula. (B) Isolado AR15. (C) Isolado LG. (D) Isolado R2P5. Aumento de 10x. 42
- Figura 8:** Zimografia dos isolados de *Acanthamoeba* antes e após a interação com células MDCK em testes de inibição com inibidor de metaloprotease EDTA 10 mM e inibidor de serinoprotease PMSF 1 mM. As amostras de meio condicionado (5mL de PYG com  $10^6$  trofozoitos, mantidos a 32°C por 24 horas) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% copolimerizado com gelatina 1 mg/mL. na proporção 1:1 com tampão de carregamento, sendo a R2P5 diluída 1:10. (A) Isolado ALX. (B) Isolado AR14. (C) Isolado LG. (D) Isolado AP4. (E) Isolado AR15. (F) Isolado R2P5. (G) Isolado interagido ALX. (H) Isolado interagido AR14. (I) Isolado interagido LG. (J) Isolado interagido AP4. (K) Isolado interagido AR15. (L) Isolado interagido R2P5. O traço simples (-) indica banda inibida pelo PMSF; o asterisco simples (\*) indica banda inibida pelo EDTA e os asteriscos duplos (\*\*) indicam bandas que surgiram após o uso dos inibidores, e que portanto estavam ausentes na amostra original. 45

- Figura 9** Comparação da atividade de proteases secretadas por trofozoítos de *Acanthamoeba* antes (PRÉ- INTERAÇÃO) e após (PÓS- INTERAÇÃO) com células MDCK. O asterisco (\*) corresponde a diferenças estatisticamente significativas avaliadas pelo teste ANOVA Two-Way e teste T 47
- Figura 10** Comparação da atividade de proteases secretadas por trofozoítos de *Acanthamoeba* antes da interação com células MDCK, nas condições “sem inibidor” (amostra original), “Tratada com PMSF” e “Tratada com EDTA” avaliadas pelo teste ANOVA Two-Way e teste T. (a) Valores com diferença significativa ( $P < 0,05$ ). 48
- Figura 11** Comparação da atividade de proteases secretadas por trofozoítos de *Acanthamoeba* após a interação com células MDCK, nas condições “sem inibidor”, “Tratada com PMSF” e “Tratada com EDTA” avaliadas pelo teste ANOVA Two-Way e teste T. Não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ). 48

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Origem, genótipo e caracterização fisiológica parcial de isolados a serem utilizados nos experimentos. 36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	percentual
°C	grau Celsius
h	hora
mg	miligrama
µL	microlitro
mL	mililitro
cm <sup>2</sup>	centr�metro quadrado
nm	nan�metro
mM	milimolar
M	molar
rpm	rota�es por minuto
U	unidade de atividade enzimática
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATCC	<i>America Type Culture Collection</i>
AVL	Amebas de Vida Livre
CA	Ceratite Amebiana
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DNA	�cido Desoxiribonucl�ico
E-64	(2S,3S)-trans-epoxysuccinyl-l-leucylamido-3-methylbutane ethyl ester
EAG	Encefalite Amebiana Granulomatosa
EDTA	�cido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
et al.	Et. alii (e colaboradores)
HEp-2	Human Epidermoid carcinoma strain #2
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Ig	Imunoglobulina
kDa	Quilodalton

MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
MIP-133	Proteína induzida por manose de aproximadamente 133 kDa
NaOH	Hidróxido de Sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonila
PYG	Meio Proteose Peptone-Extrato de Levedo-Glicose
rDNA	Ácido Desoxirribonucléico ribossomal
SFB	Soro Fetal Bovino
spp	Espécies
TCA	Ácido Tricloroacético
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
TRITON X-100	Polietilenoglicol-terc-octilfenil eter
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1. Amebas de Vida Livre .....	18
2.2. O Gênero <i>Acanthamoeba</i> .....	21
2.2.1. Morfologia.....	21
2.2.2. Identificação Morfológica e Molecular.....	23
2.3. Histórico.....	24
2.4. Infecções Causadas.....	25
2.4.1. Ceratite Amebiana.....	25
2.4.2. Encefalite Amebiana Granulomatosa.....	29
2.5. Proteases secretadas.....	30
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	35
3.1. Objetivo Geral.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	36
4.1. Amostras de <i>Acanthamoeba</i> .....	36
4.2. Curva de crescimento.....	37
4.3. Determinação do efeito citopático.....	37
4.4. Produção do meio condicionado para os ensaios de zimografia e azocaseína.....	38
4.5. Co-cultivo com células MDCK.....	38
4.6. Zimografia.....	39
4.7. Quantificação das proteases secretadas por ensaio colorimétrico.....	40
<b>5. RESULTADOS</b> .....	41
5.1. Perfil de crescimento dos isolados.....	41
5.2. Efeito citopático.....	42
5.3. Perfil de proteases secretadas em ensaio de zimografia.....	43
5.3.1. Zimografia antes da interação com células MDCK.....	43
5.3.2. Zimografia após interação com células MDCK.....	44
5.4. Ensaio de azocaseína.....	46
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	49
6.1. Perfil de Crescimento e Efeito Citopático.....	49

6.2. Proteases secretadas antes da interação com células MDCK.....	51
6.3. Interação com células MDCK altera o perfil de proteases.....	56
6.4. Perspectivas.....	58
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>60</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>81</b>

## RESUMO

As amebas do gênero *Acanthamoeba* são organismos de vida livre presentes nos mais variados ambientes, e eventualmente causam graves infecções no ser humano, como a encefalite amebiana granulomatosa e a ceratite por *Acanthamoeba*. Diferentes espécies de *Acanthamoeba* foram descritas e atualmente são classificadas em mais de 20 diferentes genótipos, com base em sequências do 18S rDNA. Um fator relacionado à patogenia e virulência de *Acanthamoeba* é a capacidade de secretar proteases, que parecem estar envolvidas na patogênese da infecção. Alguns estudos têm avaliado o perfil quantitativo e qualitativo desses produtos de secreção, buscando correlações com a virulência entre diferentes linhagens. O objetivo desse trabalho foi realizar uma análise comparativa do perfil de proteases secretadas por amostras clínicas e ambientais de *Acanthamoeba* de diferentes genótipos, e avaliar se ocorre alteração desse perfil após a interação com células de cultivo MDCK. Seis isolados de *Acanthamoeba* de origem clínica e ambiental, sendo três pertencentes ao genótipo T4 e os demais de genótipo T1, T2, e T11, foram cultivados em meio PYG a 32° C. Os isolados foram avaliados por curva de crescimento e efeito citopático sobre células MDCK. Para os ensaios de zimografia e azocaseína, utilizou-se meio condicionado a 32° C, por 24 horas. O meio condicionado também foi obtido de culturas interagidas por três dias consecutivos com células MDCK. O crescimento dos isolados foi variado e todos produziram efeito citopático. Os perfis de zimografia variaram entre os isolados, que apresentaram proteases de massa molecular entre 170 e 58 kDa, a maioria identificada pelo uso de inibidores como serinoproteases. O isolado de genótipo T1, obtido de poeira ambiental, apresentou maior produção de proteases que os demais e uma provável cisteínoprotease de alto peso molecular, ainda não descrita para esse genótipo (170 kDa). Após a interação com células MDCK, houve alteração do perfil de zimografia em todos os isolados, com a supressão de algumas proteases e o surgimento de outras, de baixa massa molecular (<60 kDa) e de uma protease que poderia ser a MIP-133 (protease induzida por manose). A quantidade de proteases das amostras interagidas foi menor que a das não interagidas. O presente estudo mostrou pela primeira vez o perfil de proteases secretadas por *Acanthamoeba* de genótipo T11 e uma possível cisteínoprotease em genótipo T1. As alterações no perfil qualitativo e quantitativo de proteases após a interação com células MDCK

indica que *Acanthamoeba* pode modular fatores associados à patogenicidade, o que representa um mecanismo adaptativo para sua sobrevivência como parasita.

Palavras chave: *Acanthamoeba*, patogenicidade, proteases, efeito citopático

## ABSTRACT

Amoebae of the genus *Acanthamoeba* are free-living organisms found in a wide range of environments, but eventually cause serious infections in humans, as granulomatous amoebic encephalitis and *Acanthamoeba* keratitis. Different species of *Acanthamoeba* have been described classified currently in more than 20 genotypes, based on 18S rDNA sequences. A factor related to the pathogenesis and virulence of *Acanthamoeba* is its ability to secrete proteases that seems to be involved in the pathogenesis of the infection. Some studies have assessed the quantitative and qualitative profile of these secretory products, seeking correlations with the virulence of different strains. The aim of this study was to perform a comparative analysis of the profile of secreted proteases for clinical and environmental samples of *Acanthamoeba* of different genotypes, and assess whether a change occurs after interaction with MDCK cells. Six clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*, belonging to genotypes T1 (one), T2 (one), T4 (three) and T11 (one), were grown in PYG medium at 32° C. Growth curves and cytopathic effect assay were performed, and trophozoites were incubated for 24 hours at 32°C to produce conditioned medium for zymography and azocasein assays. The conditioned medium was also obtained after the interaction with MDCK cells for three consecutive days. Zymography profiles varied among the isolates, that showed protease with molecular weight between 170 and 58 kDa, most identified as serine proteases. T1 genotype isolate obtained from environmental dust, showed quantitatively higher production of proteases than the others and a possible cisteinoprotease with high molecular weight (170 kDa). After interacting with MDCK cells, there was a change of zymography profile in all isolates, with the lifting of certain proteases and the emergence of others, including several low molecular weight (<60 kDa) and a protease that could be the MIP-133 (mannose-induced protease). The amount of proteases was lower in samples after interaction with MDCK cells. This study showed for the first time the protease profile of a T11 *Acanthamoeba* and a presumable cisteinoprotease of a T1 *Acanthamoeba*. Changes in proteases profile after interaction with MDCK cells indicated that *Acanthamoeba* can modulate pathogenicity factors, which can be an adaptive mechanism for its survival as a parasite. Keywords: *Acanthamoeba*, pathogenicity, proteases, CPE

## 1.INTRODUÇÃO

As amebas pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* são os protozoários de vida livre mais abundante na crosta terrestre. São encontradas nos mais variados ambientes, naturais ou artificiais, água doce e salgada, no solo e em poeira (PUSSARD e PONS, 1977).

Eventualmente podem causar infecções no ser humano, caracterizando-se como um patógeno oportunista de importância médica. Nos últimos anos, há um crescente interesse no estudo dessas amebas que podem contaminar humanos via lesões cutâneas e promover infecções senoidais que evoluem para acometimento cerebral, Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG), ou ainda afetar a córnea, determinando Ceratite Amebiana (CA). A EAG ocorre principalmente em indivíduos imunocomprometidos, enquanto a CA e outras infecções acometem também imunocompetentes (MARTINEZ e VISVESVARA, 1997).

Atualmente, o gênero *Acanthamoeba* compreende várias espécies. Um sistema de classificação baseado em genótipos tem sido usado para identificar novos isolados. Sabe-se que algumas linhagens são mais propícias a causar infecções, como é o caso dos isolados de genótipo T4 (MACIVER et al., 2013).

Um fator intrínseco ao parasito, envolvido no potencial patogênico da *Acanthamoeba*, é a presença e a produção de enzimas proteolíticas, conhecidas como proteases, que parecem ser importantes no desenvolvimento da infecção (MITRO et al., 1994; ALFIERI et al., 2000). Todas as espécies de *Acanthamoeba*, seja patogênica, isolada de caso clínico, ou ambiental secretam proteases que podem lesar as células alvo por meio da degradação de ligações peptídicas. Um repertório de enzimas, predominantemente serinoproteases, mas também cisteíno e metaloproteases, têm sido identificadas em meio condicionado com trofozoítos desse protozoário (MITRO et al., 1994; SERRANO-LUNA et al., 2006; SOUZA-CARVALHO et al., 2011). Alguns autores têm demonstrado que cepas isoladas de casos clínicos secretam proteases em maiores quantidades (KHAN, 2006; KOESHLER et al., 2009).

Além disso, não é conhecido se o perfil de proteases secretadas é uma característica de determinados isolados ou se pode ser modulada de acordo com condições como contato com o hospedeiro ou outros fatores ativadores de patogenicidade (DE JONCKHEERE, 1980; WALOCHNIK et al., 2000; KHAN, 2001; CULBERTSON et al., 1958; VAN KLINK et al., 1993).

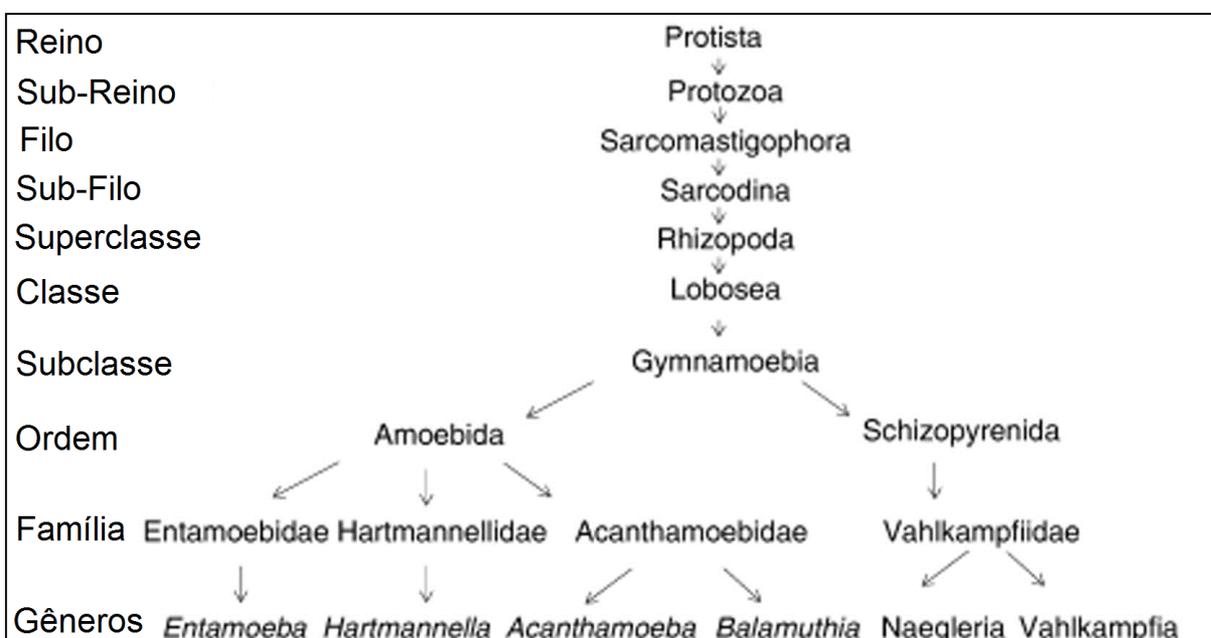
Sabe-se que o cultivo axênico prolongado pode regular negativamente as propriedades de virulência do protozoário. Fato contornável através da interação da *Acanthamoeba* com componentes do hospedeiro *in vitro* (KOESHLER et al., 2009) ou *in vivo* (VERÍSSIMO et al., 2013), que é capaz de induzir maior produção de proteases e de características de virulência. No entanto, não é conhecido se para todas as linhagens de *Acanthamoeba* o contato com componentes do hospedeiro levaria a ativação de características de virulência.

Considerando a diversidade do gênero *Acanthamoeba* e que as proteases secretadas parecem ser um importante fator de patogenicidade e virulência desses microrganismos (VERISSIMO et al., 2012), a investigação do perfil quantitativo e qualitativo de proteases secretadas por diferentes isolados pode auxiliar na compreensão de questões ligadas à patogênese desse organismo (SOUZA-CARVALHO et al., 2011; VERISSIMO et al., 2012).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Amebas de Vida Livre

De acordo com a classificação taxonômica clássica, as Amebas de Vida Livre (AVL) são protozoários da classe *Lobosea* com algumas espécies potencialmente patogênicas. Essas espécies pertencem a três famílias: **Hartmannellidae** e **Acanthamoebidae** (da ordem **Amoebida**) e **Vahlkampfilidae** (da ordem **Schizopyrenida**) (Figura 1) (LEVINE et al., 1980; CORLISS, 2001).



**Figura 1:** Classificação dos principais gêneros de amebas de vida livre, segundo Levine e colaboradores (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003 - modificado).

As AVL constituem um grupo de protozoários de ampla dispersão ambiental, isolados em praticamente todos os ambientes: água, solo e ar, em todos os continentes e nas mais diversas altitudes. Também são resistentes as condições extremas de temperatura e pH, bem como a alguns sistemas de desinfecção, produtos químicos e salinidade. As AVLs são encontradas nos mais variados ambientes, assim como: na água para consumo humano, nos vegetais, nos animais, nas lentes de contato inclusive em sua solução de limpeza e estojo de

armazenamento e no ambiente hospitalar (CURSONS, 1980; SILVA e ROSA, 2003; KHAN, 2006; CARLESSO et al., 2007; VISVESVARA et al., 2007; CALIXTO et al., 2014; NIYYATI et al., 2014; PADZIK et al., 2014). As AVL também foram isoladas de diversas partes do corpo humano, de indivíduos saudáveis e infectados, tais como: cavidade nasal, faringe, intestino, tecidos infectados, cérebro, pulmão, pele e córnea (VISVESVARA et al., 1983; WALOCHNIK et al., 2000; SILVA e ROSA, 2003; VISVESVARA et al., 2010; ROCHA-CABRERA et al., 2015).

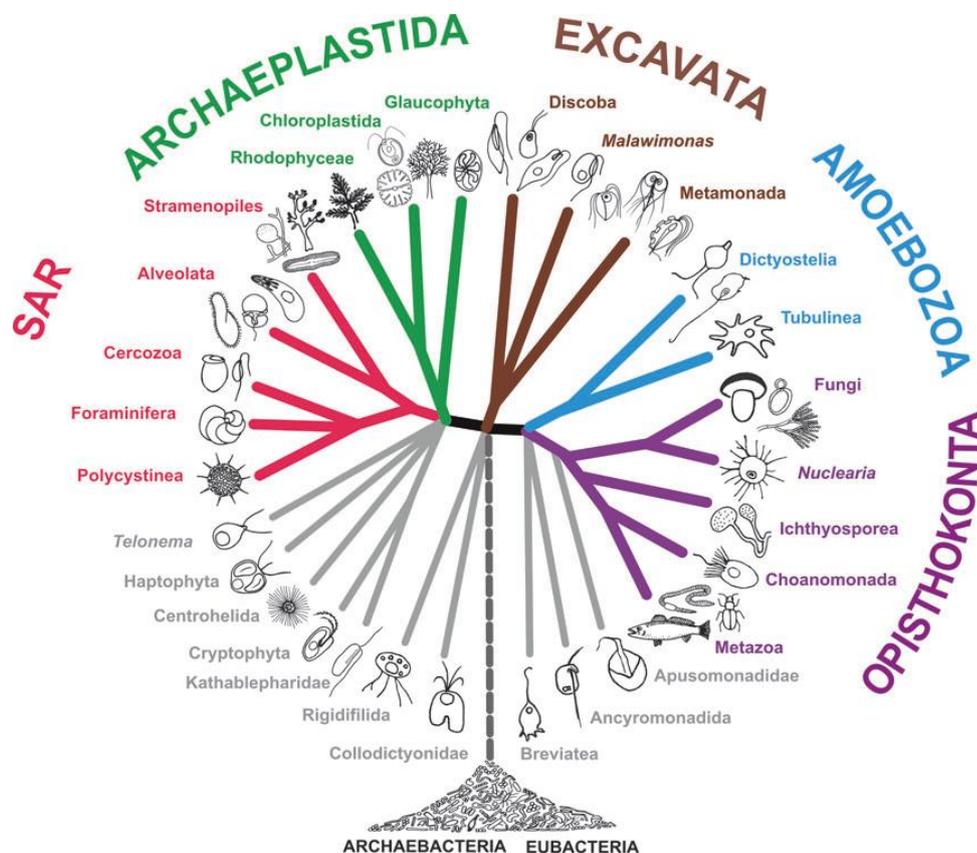
As AVL são organismos considerados potencialmente patogênicos, pois em algumas situações como a ocorrência de lesões prévias ou em caso de comprometimento do sistema imune, podem atuar como parasitas, causando cegueira, morte ou incapacidade permanente (PAGE, 1974; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; SCHUSTER e VISVESVARA, 2004; AWWAD et al., 2007). As três principais AVL potencialmente patogênicas para o homem e animais são: *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp e *Balamuthia mandrillaris*, as quais têm sido relacionadas com meningoencefalites, ulcerações da pele e infecções da córnea (SCHUSTER e VISVESVARA, 2004; QVARNSTROM et al., 2006; VISVESVARA et al., 2010; ZANELLA et al., 2012).

Em 1998, no Texas, foi identificada mais uma AVL capaz de causar EAG em humanos saudáveis. Caracterizada morfológicamente, por microscopia eletrônica como *Sappinia diploidea*, mais tarde, por caracterização genética foi determinada como *Sappinia pedata*. Ambas, até então, haviam sido isoladas no ambiente, proveniente de fezes de animais herbívoros. E, na literatura, até então, há somente esse relato de infecção em humano (GELMAN et al., 2001; QVARNSTROM et al., 2009; TRABELSI et al., 2012; VISVESVARA, 2013).

Apesar de vigorar na atualidade, a classificação em sistemas hierárquicos foi abandonada pela Sociedade Internacional de Protozoologia. Em 2005, foi proposta uma nova forma de divisão dos eucariotos, baseada em abordagens morfológicas, bioquímicas e moleculares mais modernas, em 6 super grupos: *Amoebozoa*, *Opisthokonta*, *Rhizaria*, *Archaeplastida*, *Chromalveolata* e *Excavata*. As AVLs *Acanthamoeba* e *Balamuthia* foram classificadas no super grupo *Amoebozoa*: *Acanthamoebidae*; *Naegleria fowleri* no super grupo *Excavata*: *Heterolobosia*:

Vahlkampfiidae; e Sappinia no super grupo Amoebozoa: Flabellinea: Thecamoebidae (ADL et al., 2005).

A forma de divisão dos eucariotos foi revisada, recentemente, em 2012, pela Sociedade Internacional de Protozoologia. O objetivo foi incorporar, na categorização dos protistas, os recentes avanços obtidos por meio das análises filogenéticas e filogenômicas e atualizar a divisão de maneira prática. Foi proposta a redução do número de grupos, de seis para cinco, sendo eles: *Amoebozoa*, *Opisthokonta*, *SAR* (que inclui o antigo grupo Rhizaria, além de Stramenopiles, Alveolates), *Archaeplastida* e *Excavata*. As AVLs *Acanthamoeba* e *Balamuthia* foram classificadas no grupo Amoebozoa: Discosea: Longamoebia: Centramoebida; *Naegleria fowleri* no grupo Excavata: Discoba: Discicristata: Heterolobosea: Tetramitia; e Sappinia no grupo Amoebozoa: Discosea: Longamoebia: Thecamoebida (**Figura 2**) (ADL et al., 2012).



**Figura 2:** Classificação dos principais gêneros de amebas de vida livre, segundo ADL e colaboradores, 2012 (ADL et al., 2012).

## 2.2. O gênero *Acanthamoeba*

### 2.2.1. Morfologia

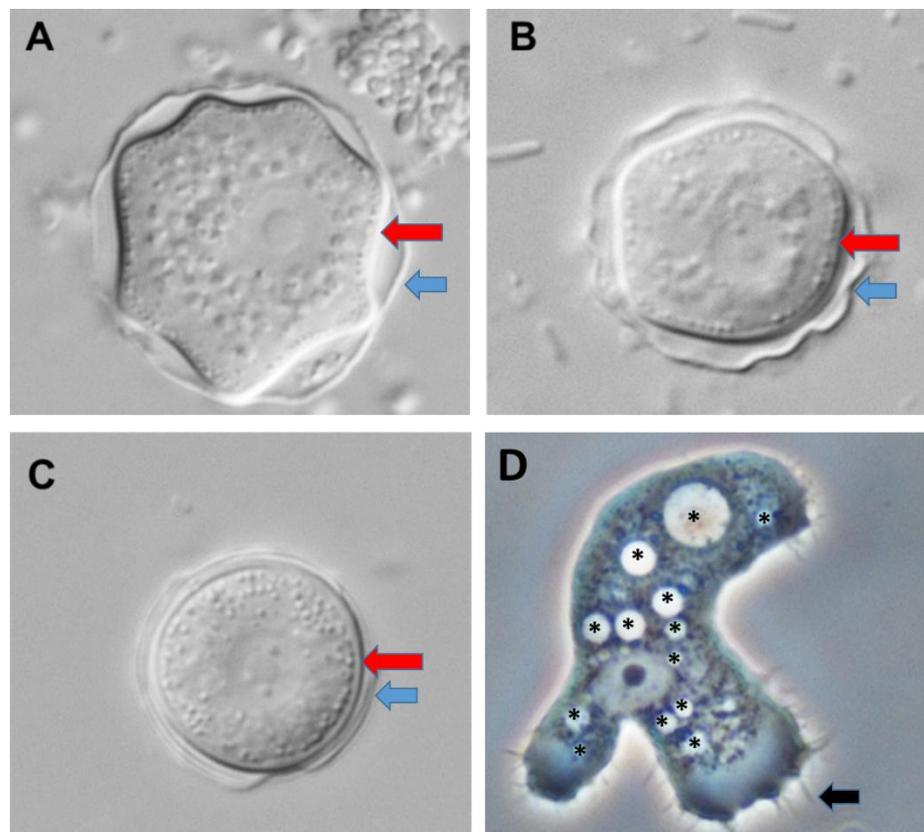
As amebas do gênero *Acanthamoeba* apresentam duas formas evolutivas em seu ciclo de vida, a fase de trofozoíto, ativa, que exhibe crescimento vegetativo, e a fase de cisto com mínima atividade metabólica (SIDDIQUI e KHAN, 2012). Ambas as fases podem ser encontradas em tecidos infectados e no ambiente (YUEHUA et al., 2014).

A dimensão dos trofozoítos pode variar significativamente entre os isolados pertencentes a diferentes espécies/genótipos, medindo de 8 a 40  $\mu\text{m}$  de diâmetro (CLARKE e NIEDERKORN, 2006). Possui núcleo único, centralizado, com nucléolo proeminente, citoplasma finamente granular com vacúolos alimentares e um ou mais vacúolos contráteis, e típicos pseudópodes finos, denominados acanthopódios, responsáveis pela denominação do gênero. Os acanthopódios são importantes para a adesão a superfícies, movimentação celular e captura de alimento (KHAN, 2006; VISVESVARA et al., 2007) (**Figura 3D**). A função dos vacúolos contráteis proeminentes é expelir a água para a regulação osmótica, já os outros tipos de vacúolos incluem lisossomas, vacúolos digestivos e um grande número de vacúolos contendo glicogênio (BOWERS e KORN, 1973).

O trofozoíto é a forma infectante, que apresenta reprodução assexuada, por fissão binária. No ambiente se alimenta de pequenas algas, bactérias e outros protozoários, enquanto na córnea, se alimenta de queratinócitos (YUEHUA et al., 2014). *Acanthamoeba* parece desempenhar um papel importante na regulação das populações bacterianas no ambiente e na ciclagem de nutrientes, contribuindo assim para o funcionamento dos ecossistemas (SIDDIQUI e KHAN, 2012).

Os cistos são formas de resistência dos trofozoítos, resultantes da diferenciação celular ocorrida devido a exposição às condições adversas. Possui estrutura arredondada com parede dupla que varia em tamanho de 5 a 25  $\mu\text{m}$ . São uninucleados com denso nucléolo central, e possuem poros conhecidos como

ostíolo, que são utilizados para monitorar as alterações ambientais, e é por onde os trofozoítos emergem sob condições favoráveis. A parede exterior dos cistos (ectocisto) é constituída de proteínas, polissacárideos e lípideos, enquanto a parede interna (endocisto) contém celulose (KHAN, 2006; VISVESVARA et al., 2007; SIDDIQUI e KHAN, 2012) (**Figura 3A-C**). Os cistos podem permanecer viáveis durante vários anos e são altamente resistentes a muitos agentes antimicrobianos (OMANA-MOLINA et al., 2013).



**Figura 3.** (A) Cisto de *Acanthamoeba* do grupo morfológico I (B) Cisto de *Acanthamoeba* do grupo morfológico II (C) Cisto de *Acanthamoeba* do grupo morfológico III (D) Trofozoíto de *Acanthamoeba*. Nos cistos é possível visualizar o ectocisto (seta azul) e endocisto (seta vermelha), pela técnica de microscopia de campo claro. No trofozoíto é possível observar acantopódio (seta preta) e vacúolos (\*), visíveis pela microscopia de contraste de fase. Adaptado de LORENZO-MORALES et al., 2015.

### 2.2.2. Identificação Morfológica e Molecular

O gênero *Acanthamoeba* compreende mais de 20 espécies que foram descritas com base em características morfológicas dos cistos (PUSSARD e PONS, 1977). No entanto, existe grande dificuldade na distinção de certas espécies por estes critérios, devido às suas similaridades morfológicas e variação na morfologia de cistos de uma mesma linhagem.

Outro sistema de classificação morfológica proposto por PUSSARD e PONS (1977) é o que determina a existência de três grupos, com base na morfologia dos cistos. No grupo I estão os cistos de tamanho maior que 18  $\mu\text{m}$  com ectocisto liso e endocisto geralmente estrelado, com variado número de braços (**Figura 3A**). No grupo II o ectocisto é ondulado ou rugoso e segue o contorno do endocisto, que pode ser ovalado, levemente estrelado ou poliédrico (**Figura 3B**). No grupo III estão os cistos com ectocisto liso ou levemente rugoso e com endocisto ovalado (**Figura 3C**) (PUSSARD e PONS, 1977; VISVESVARA et al., 2007). Classificar certos isolados por esse sistema também é difícil, pois pode haver variabilidade na morfologia dos cistos decorrente das condições de cultivo (VISVESVARA et al., 2007).

Atualmente, a tendência é utilizar a análise de sequências do gene 18S rDNA de *Acanthamoeba* para determinar seus genótipos. A comparação de sequências desse gene foi usada inicialmente por STOTHARD et al. (1998), que identificou os genótipos T1 a T12 entre diferentes amostras de *Acanthamoeba*. Cada genótipo exibe ao menos 5% de divergência genética (STOTHARD et al., 1998; SCHROEDER et al., 2001). Posteriormente, outros autores identificaram oito genótipos adicionais, ou seja, *Acanthamoeba* pode ser classificada dentro dos genótipos T1 a T20 (SCHROEDER et al., 2001; NUPRASERT et al., 2010; MAGNET et al., 2012; CORSARO e VENDITTI, 2010).

O genótipo T4 é o mais encontrado nos casos de CA e EAG (STOTHARD et al., 1998; SCHROEDER et al., 2001; BOOTON et al., 2005). Um estudo recente avaliou a prevalência de genótipos com base em dados da literatura, indicando que o T4 ainda é o mais observado em infecções humanas (MACIVER et al., 2013). No

entanto, considerando que *Acanthamoeba* de outros genótipos também podem causar infecções (BOOTON et al., 2005), outros fatores do parasito e do hospedeiro parecem estar associados à patogênese.

### 2.3. Histórico

O primeiro relato de isolamento de ameba ocorreu em 1913, por PUSHKAREW. Isolada de poeira, a ameba foi nomeada *Amoeba polyphagus*. Em 1930, em uma placa de cultura de leveduras *Cryptococcus pararoseus*, foi isolada uma ameba contaminante, classificada inicialmente como *Hartmannella* e posteriormente identificada como *Acanthamoeba castellanii* (VISVESVARA et al., 2007; MAGLIANO, 2011; YOUSUF et al., 2013).

Em 1958, durante os testes de segurança para o desenvolvimento da vacina da poliomielite, culturas celulares foram contaminadas com um microorganismo, o qual suspeitava ser um vírus desconhecido. Esse fluido contaminado foi inoculado em ratos e macacos, que após uma semana vieram a óbito, por desenvolverem encefalite. Nas lesões cerebrais dos animais foi visualizada a presença de amebas. E, nas culturas contaminadas, foram isolados cistos e trofozoítos de amebas, identificada como *Acanthamoeba culbertsoni*. CULBERTSON e colaboradores propuseram que uma infecção semelhante poderia ocorrer em seres humanos. Esse foi o primeiro episódio em que se suspeitou que amebas tivessem potencial patogênico, o que despertou o interesse médico e epidemiológico para desvendar essa patogenia (CULBERTSON et al., 1959; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; VIVESVARA et al., 2007; CARLESSO et al., 2007).

Em 1972, foi relatado o primeiro caso de EAG, causado por *Acanthamoeba*, em um indivíduo imunocomprometido (KHAN, 2006; CARLESSO et al., 2007). Em 1974, NAGINGTON e colaboradores descreveram os primeiros casos de ceratite por *Acanthamoeba*, no Reino Unido, em pacientes com uveíte resistente ao tratamento. No ano seguinte, surgiu um caso nos Estados Unidos, descrito por JONES e colaboradores, que culminou em comprometimento do sistema nervoso central

(SCHUSTER e VISVESVARA, 2004). Em 1976 e 1979 RINGSTED et al. e GULLETT et al., respectivamente, descreveram casos de EAG a partir de lesões epiteliais. No Brasil, os primeiros casos de encefalite foram relatados entre 1976 e 1978 por FORONDA et al., CAMPOS et al. e SALLES-GOMES et al., respectivamente. E os primeiros casos de ceratite foram descritos em 1988, por NOSÉ e colaboradores (SILVA e ROSA, 2003; CARVALHO et al., 2009).

Em 1980, MARTINEZ e colaboradores correlacionou a infecção sistêmica por *Acanthamoeba* com sua ocorrência em pacientes imunocomprometidos, classificando-a como infecção oportunista. Atualmente, sabe-se que várias espécies de *Acanthamoeba* são capazes de provocar doenças: *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. astronyxis*, e *A. divionensis* (VISVESVARA et al., 2007; PACHECO e MARTINS, 2008; CALIXTO et al., 2014).

## 2.4 Infecções Causadas por *Acanthamoeba*

### 2.4.1 Ceratite Amebiana

Espécies de *Acanthamoeba* são capazes de causar uma grave infecção da córnea conhecida como Ceratite Amebiana. Dolorosa, com desdobramentos penosos e potencial para causar a perda da visão e enucleação, a CA acomete indivíduos imunocompetentes (JONES et al., 1975; DOUGHERTY et al., 1994; SEAL, 2003; VISVESVARA et al., 2007). O principal fator de risco é uso das lentes de contato que é capaz de causar alterações epiteliais na córnea e reduzir sua resistência a invasão microbiana (MIEDZIAK et al., 1999; BOURCIER et al., 2003; SACRAMENTO et al., 2005). Entretanto também são reportados casos em indivíduos não usuários de lente, que sofreram trauma na córnea, inclusive cirúrgico (SHARMA et al., 1990; SHARMA et al., 2000; SYAM et al., 2005).

A CA é uma infecção progressiva da córnea que ocorre a partir de condições que promovam microtraumas, associados à contaminação deste local. A evolução dessa infecção pode resultar em necessidade de transplante de córnea e em alguns casos,

perda da visão. Nas últimas décadas, tem aumentado a frequência da infecção devido ao aumento do principal grupo de risco: os usuários de lentes de contato (RADFORD et al., 2002; STAPLETON et al., 2009,). Um fator agravante para o risco de infecção é o fato de que as soluções de limpeza da lente de contato, comercializadas atualmente, possuem apenas efeito amebostático e não amebicida (PADZIK et al., 2014). Além disso, a superfície plástica da lente é relativamente resistente a antibióticos e anti-sépticos, propiciando a formação de biofilme, que atua como nicho atraente para microrganismos, inclusive amebas de vida livre (NIYYATI et al., 2014).

Os microtraumas na córnea promovem a adesão de trofozoítos à camada epitelial, levando à destruição do estroma da córnea (**Figura 4B**) com o auxílio de proteases extracelulares secretadas (DEBBASCH et al., 1999; KHAN, 2006; CARVALHO et al., 2009; SOUZA-CARVALHO et al., 2011). Sob condições adversas promovidas pelo sistema imune ou pelos medicamentos, os trofozoítos se transformam em cistos. Os cistos são responsáveis pela resistência ao tratamento, recidivas ou recorrências após o transplante de córnea, pois podem se reativar em condições oportunas (KHAN, 2003).

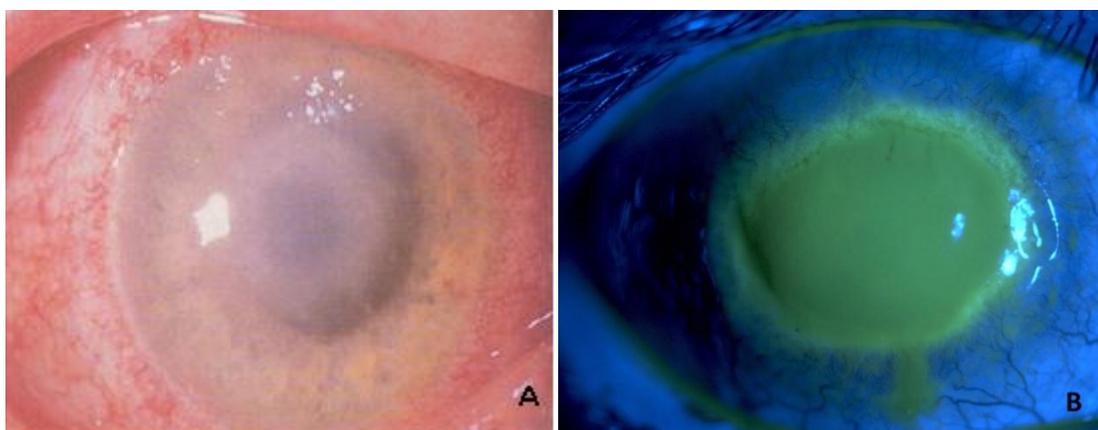
O indivíduo que desenvolve CA apresenta visão borrada, dor intensa, fotofobia, blefaroespasmos, sensação de corpo estranho nos olhos e lacrimejamento. Outros possíveis sintomas são diminuição da sensibilidade corneana, iríte, uveíte, esclerite, hifema, hipópico e aumento da pressão intra-ocular (ALVARENGA et al., 2000; OBEID et al., 2003; LORENZO-MORALES et al., 2015).

O infiltrado em anel ou infiltrado estromal disciforme (**Figura 4A**) é característico de vários processos infecciosos (SHARMA et al., 1990; BACON et al., 1993; ALVARENGA et al., 2000). Observado em cerca de 50% dos pacientes com CA (LORENZO-MORALES et al., 2015), possivelmente é provocado por enzimas colagenolíticas produzidas pelo parasita para infiltração no estroma. (HE et al., 1990; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; CLARKE e NIEDERKORN, 2006; SOUZA-CARVALHO et al., 2011)

O quadro típico é unilateral, mas existem casos de bilateralidade, e progride lentamente. A infecção é mais comum em adultos jovens, por ser a população que

mais freqüentemente é usuária de lentes de contato (ALVARENGA et al., 2000; OBEID et al., 2003; SOUSA et al., 2008). A frequência da infecção é semelhante em homens e mulheres, e tem aumentado entre a população brasileira nos últimos anos. (MORIYAMA e HOFLING-LIMA et al., 2008; SOUSA et al., 2008; CARVALHO et al., 2009)

Dentre os fatores de risco para a infecção, os principais são danos a córnea e falha no processo de desinfecção das lentes de contato de uso diário, tal como o uso de água da torneira para limpar as lentes e o estojo de armazenamento (RADFORD et al., 2002; OBEID et al., 2003; KHAN, 2006; CARVALHO et al., 2009). Apesar do uso de produtos específicos diminuir os riscos de infecção, a desinfecção química com soluções de limpeza para lentes de contato é ineficaz contra trofozoítos e cistos que ficam aderidos ao plástico da lente, pois apresentam apenas efeito amebostático (NIYYATI et al., 2014; PADZIK, et al., 2014). Apenas a desinfecção térmica é totalmente efetiva contra *Acanthamoeba* (FREITAS et al., 1989).



**Figura 4:** (A) Infiltrado em anel em paciente com CA (KANSKI, 2004). (B) Lesões na córnea de um paciente com CA após a aplicação de fluoresceína de sódio (LORENZO-MORALES et al., 2015)

Em sua fase inicial, a CA pode ser diagnosticada como ceratite dendrítica resultante do vírus herpes simplex ou adenovírus, devido a diminuição da sensibilidade da córnea. 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, pois exibem sintomatologia semelhantes (ALVARENGA et al., 2000; KHAN, 2006; VISVESVARA et al., 2007; ROCHA-AZEVEDO et al., 2009;

LORENZO-MORALES et al., 2015). Assim, a maioria dos casos é diagnosticado tardiamente, o que prejudica muito o sucesso da terapia, uma vez que a detecção da doença na fase inicial e a abordagem terapêutica precoce são capazes de melhorar o prognóstico da infecção (ALVARENGA et al., 2000; VISVESVARA et al., 2007).

O diagnóstico provisório de CA pode ser feito por microscopia confocal, em que é possível detectar rapidamente os cistos de *Acanthamoeba* na córnea (WINCHESTER et al., 1995; JOSLIN et al., 2006; PARMAR et al., 2006; VILLANI et al., 2014). Entretanto, o diagnóstico definitivo e confiável para CA é baseado na visualização direta do agente causador, mediante exame microscópico, em um espécime de raspado da córnea, biópsia, ou cultivo de tecidos infectados (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; LAKOMY et al., 2005; VISVESVARA et al., 2007). O padrão ouro de diagnóstico laboratorial para *Acanthamoeba* é a cultura (LORENZO-MORALES et al., 2015). Existem também várias técnicas baseadas em PCR que apresentam maior sensibilidade para detecção de *Acanthamoeba* em material de biópsia, apesar de não ser genótipo específica (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; LAKOMY et al., 2005; LORENZO-MORALES et al., 2015). Técnicas sorológicas para detecção de anticorpos são ineficazes devido à ubiquidade de *Acanthamoeba* (KHAN e TAREEN, 2003; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004).

O tratamento da CA é longo, de 6 a 12 meses de duração, e dispendioso, requer hospitalização para iniciá-lo, e o uso de vários medicamentos. E mesmo em um tratamento bem conduzido, ainda podem ocorrer complicações envolvendo o prognóstico funcional, e até mesmo ser necessário o transplante de córnea. Vários agentes antimicrobianos podem ser usados: aminoglicosídeos, imidazoles, antiparasitários, antifúngicos, anti-sépticos catiônicos, e em casos de resistência é recomendada a combinação desses agentes. O uso de esteroides é controverso, sendo não indicado na fase inicial, pois pode causar supressão imunológica do paciente. Mas, em caso de infecção com inflamação persistente, poder ser usado associado a antimicrobianos (ALVARENGA et al., 2000; OBEID et al., 2003; LAKOMY et al., 2005; SOUSA et al., 2008; LORENZO-MORALES et al., 2015).

#### 2.4.2 Encefalite Amebiana Granulomatosa

Encefalite amebiana granulomatosa (EAG) é uma infecção do sistema nervoso central, rara, com progresso lento, causada por *Acanthamoeba* (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Geralmente fatal, com uma taxa de mortalidade de 85% (ZAMORA et al., 2014), acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, sendo eles: pacientes com HIV/AIDS, doenças linfoproliferativas, diabetes mellitus, insuficiência renal, cirrose hepática, lúpus, tuberculose, alcoolismo crônico, as mulheres grávidas, indivíduos desnutridos, submetidos a radioterapia, transplante de órgãos/tecidos, com terapia imunossupressora baseada no excesso de esteróides e antibióticos, dentre outros (KHAN, 2006).

Supõe-se que a porta de entrada ocorra a partir de lesões cutâneas ou por via respiratória, com o parasito se disseminando por via hematogênica até o encéfalo (MARTINEZ e VISVESVARA, 1997). Várias espécies de *Acanthamoeba* podem causar EAG, sendo elas: *A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. healyi* e *A. divionensis* (SCHUSTER e VISVESVARA, 2004; VISVESVARA et al. 2007)

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. A morte é devido a hemorragia, lesões necróticas com irritação meníngea grave e encefalite (KHAN, 2006).

Devido à dificuldade de estabelecer a suspeita clínica, uma vez que os sintomas clínicos se assemelham a meningite viral, bacteriana ou tuberculose, os pacientes quase sempre evoluem para o óbito (ROCHA-AZEVEDO et al., 2009; VISVESVARA et al. 2010; QVARNSTROM et al., 2013). O diagnóstico da maioria dos casos é realizado *pos-mortem* e na necropsia são visualizados edema grave e necrose hemorrágica (SIDDIQUI e KHAN, 2012).

O diagnóstico rápido e definitivo é feito pela visualização dos trofozoítos ou cistos em amostras de tecido, por qualquer coloração ou técnica microscópica. Sendo que

o protozoário pode ser cultivado facilmente *in vitro* em meios especiais (ZAMORA et al., 2014). Raramente são demonstrados trofozoítos pela análise do líquido cefalorraquidiano (VISVESVARA et al., 2007). Sorologia para anticorpos específicos de ameba tem baixa especificidade. E a detecção de *Acanthamoeba* por métodos moleculares é rapidamente conseguido, sendo o diagnóstico a nível de gênero suficiente para reconhecer se um indivíduo está infectado (ROCHA-AZEVEDO et al., 2009).

Não existem tratamentos recomendados para EAG, devido à baixa sensibilidade de *Acanthamoeba* a muitos agentes antimicrobianos e à incapacidade destes compostos de atravessar a barreira hematoencefálica, no sistema nervoso central. (KHAN, 2006; SIDDIQUI e KHAN, 2012). Além disso a raridade da infecção dificulta estudos para determinar tratamentos eficazes, assim, as recomendações de tratamento dependem exclusivamente de relatos de casos com resultados bem sucedidos (ZAMORA et al., 2014). Os esquemas terapêuticos são poli-quimioterápicos e incluem uma combinação de cetoconazol, fluconazol, sulfadiazina, isetionato de pentamidina, anfotericina B, azitromicina, itraconazol, voriconazol, rifampicina, flucitosina, sulfametoxazol-trimetoprim, e miltefosine que podem ser eficazes (KHAN, 2006; VISVESVARA et al., 2007; SIDDIQUI e KHAN, 2012). Em muitos casos, contudo, a terapêutica teve de ser descontinuada por causa dos efeitos secundários indesejáveis dos medicamentos (KHAN, 2006; VISVESVARA et al., 2007).

## 2.5 Proteases secretadas de *Acanthamoeba*

Proteases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise das ligações peptídicas. Pertencente ao grupo das hidrolases, são enzimas proteolíticas encontradas em todas as células e tecidos, onde degradam proteínas desnecessárias ou danificadas, além de ajudar na digestão de alimentos proteicos (LEHNINGER, 1995; YANG et al., 2015).

Vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos são capazes de produzir enzimas hidrolíticas, constitutivas ou induzíveis, extra ou intracelulares, ligadas ou não a membrana. Sendo que as proteases são capazes de produzir danos a membrana da célula do hospedeiro e facilitar a migração desses microrganismos pelos tecidos. Grandes quantidades dessas proteases são secretadas por isolados clínicos de *Acanthamoeba*, e também por isolados ambientais, em menor proporção (KHAN, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2015).

O principal papel fisiológico das proteases é a degradação de substrato para fins de alimentação (KHAN, 2006), o que justifica o fato de serem observados em outras amebas de vida livre, como *Naegleria*, *Balamuthia*, *Entamoeba*, e em outros protozoários como *Leishmania*, *Plasmodium*, *Giardia* e *Trypanosoma* (KLEMBBA e 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; SERRANO-LUNA et al., 2013; YANG et al., 2015). Recentemente, foi comprovada a relação entre as proteases secretadas por *Acanthamoeba* e a capacidade de provocar inflamação alérgica das vias aéreas de humanos, semelhante a Asma (PARQUE et al., 2014).

As proteases são classificadas de acordo com o grupo químico do importante resíduo de aminoácido presente no sítio ativo que participa da reação de hidrólise. São quatro classes principais reconhecidas em *Acanthamoeba*: serinoprotease, metaloprotease, cisteínoprotease e proteases aspárticas (KHAN, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2015; YANG et al., 2015). *Acanthamoeba* é capaz de produzir todas as classes de proteases. Dentre as enzimas proteolíticas, as serinoproteases parecem ser as mais abundantes em quase todos os genótipos, com peso molecular variando entre 20-200 kDa, estão envolvidas na reprodução e evasão do sistema imunitário do hospedeiro (KHAN et al., 2000; KIM et al., 2003; KHAN, 2006; SISSONS et al., 2005; VISVESVARA et al., 2007; YANG et al., 2015).

Vários estudos têm mostrado que diversas proteases podem desempenhar importante papel na instalação das infecções por *Acanthamoeba* (KHAN, 2006).

Isolados, de genótipo T4, apresentaram serinoproteases de pesos moleculares variados, aproximados de 36, 49 e 66 e 107 kDa (MITRO et al., 1994; KHAN et al., 2000), e 27, 47, 60, 75, 100 e 110 kDa (ALFIERI et al., 2000). As serinoproteases de 70 a 130 kDa são possíveis elastases que degradam proteínas do tecido conjuntivo, tais como fibras elásticas, proteoglicanos dentre outros, com ampla especificidade (CLARKE e NIEDERKORN, 2006; KHAN, 2006; KHAN, 2009, LORENZO-MORALES et al., 2013; LORENZO-MORALES et al., 2015).

Alguns trabalhos avaliam proteases específicas, como a serinoprotease de 33 kDa, secretada por isolados clínicos e ambientais, descrita e caracterizada por KONG et al. (2000). Essa protease apresentou atividades de degradação dos componentes protéicos da matriz extracelular e soro, incluindo colágenos tipo I e IV, fibrinogênio, fibronectina, IgG, IgA, albumina e hemoglobina. Estas propriedades desempenham papéis críticos para a invasão da *Acanthamoeba* no estroma corneano, e na patogênese da EAG (KIM et al., 2003; KIM et al., 2006).

Em isolados de *Acanthamoeba* pertencente ao genótipo de T4 foi observada uma serinoprotease de 40 kDa capaz de ativar a clivagem do plasminogênio em plasmina no hospedeiro. A serinoprotease ativa uma metaloprotease, presente na membrana do hospedeiro, que tem a função de degradar a membrana basal e os componentes da matriz extracelular (MITRA et al., 1995; KHAN, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2015).

Sem correlação com um genótipo previamente estabelecido, *Acanthamoeba* também é capaz de secretar serinoproteases de aproximadamente 42 kDa e 12 kDa que degradam imunoglobulinas, inibidores de protease e interleucina-1 (CHO et al., 2000; NA et al., 2001; KHAN, 2006).

Os trofozoítos de *Acanthamoeba* são capazes de se ligar, por meio de suas proteínas ligadoras de manose, com proteínas presente na superfície da córnea, e induzir a secreção de uma serinoprotease de 133 kDa, chamado MIP133. Essa protease é importante na patogênese da CA, pois é capaz de induzir a degradação de células epiteliais oculares, devido a sua considerável atividade citolítica (HURT et al., 2003; GARATE et al., 2004; ALIZADEH et al., 2005; GARATE et al., 2005; CLARKE e NIEDERKORN, 2006; KHAN, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2015).

Essa serinoprotease também foi identificada como principal determinante responsável pela alteração de permeabilidade na barreira hemato-encefálica, provocada pela *Acanthamoeba*, na EAG (ALSAM et al., 2005; VISVESVARA et al., 2007).

Cisteínoproteases foram identificadas em genótipo T4 de *Acanthamoeba*, incluindo 43, 65, 70 e 130 kDa. Sendo possível que as proteases de 65 kDa e 70 kDa sejam as mesmas, considerando apenas uma pequena variação na mobilidade da protease nos géis de substrato (ALFIERI et al., 2000; KHAN, 2006; KHAN, 2009; LORENZO-MORALES et al., 2015). Uma cisteinoprotease de 24 kDa, provavelmente intracelular, foi identificada a partir de um isolado de genótipo T12 (HONG et al., 2002). O papel fisiológico destas proteases é proteger a *Acanthamoeba* de dano intracelular durante a infecção do hospedeiro, e também é importante para o processo de encistamento do parasita sob condições adversas (LEE et al., 2013).

Além disso, cisteínoproteases denominadas metacaspases do tipo I, que são importantes reguladoras da morte celular programada, também foram descritas em *Acanthamoeba*. Estudos sugerem que essas proteases estão associadas com a formação, o funcionamento e a regulação da função do vacúolo contrátil do protozoário, que desempenha papel essencial na regulação osmótica da célula (SAHEB et al., 2013; SAHEB et al., 2014; LORENZO-MORALES et al., 2015).

Existem também evidências de atividade de metaloprotease, em co-cultura com células hospedeiras. A adesão dos trofozoítos às células hospedeiras induziria a secreção de uma metaloprotease de 80 kDa (MITRO et al., 1994; CAO et al., 1998; ALFIERI et al., 2000; KHAN, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2015). Em isolado de genótipo T1, de paciente com EAG, foi possível identificar uma metaloprotease de 150 kDa. Provavelmente essa protease desempenha papel crucial na invasão do tecido cerebral pois tem capacidade de degradar matriz extracelular, ao exibir atividade contra seus principais componentes: colágeno tipo I e III, elastina, plasminogénio, além de apresentar atividade de degradação da caseína, gelatina e hemoglobina (ALSAM et al., 2005; SISSONS et al., 2005; KHAN, 2006; VISVESVARA et al., 2007; LORENZO-MORALES et al., 2015).

As enzimas proteolíticas secretadas são essenciais nos mecanismos de patogênese da *Acanthamoeba* (SOUZA-CARVALHO et al., 2011). Segundo KOESHLER e colaboradores (2009), a capacidade da *Acanthamoeba* de secretar protease aumenta a partir do contato com a célula do hospedeiro, uma que vez que demonstrou que isolados submetidos a cultivo axênico prolongado secretam menos proteases que aqueles interagidos com células humanas HEp-2 in vitro. SOUZA-CARVALHO e colaboradores (2011), também correlacionou a manifestação clínica CA com serinoproteases de baixo peso molecular secretada pelos isolados clínicos. E OMANA-MOLINA e colaboradores (2013) concluiu que as proteases auxiliam na disjunção das células MDCK in vitro, o que auxilia no processo infeccioso.

As proteases de *Acanthamoeba* são consideradas um importante fator associado à patogenicidade e virulência desse protozoário. A produção dessas enzimas ocorre tanto por isolados clínicos quanto por ambientais, mas alguns estudos têm indicado que isolados clínicos apresentam níveis mais elevados de proteases extracelulares, sugerindo que *Acanthamoeba* as utiliza para facilitar o processo de invasão ao hospedeiro (MITRO et al., 1994; KHAN, 2006). Um estudo em particular, de KOESHLER et al. (2009), demonstrou que a associação de uma cultura de *Acanthamoeba* com células de cultivo levou a um aumento da produção de proteases por essa cepa. Considerando que esse estudo utilizou uma única cepa, estabelecemos nesse trabalho o objetivo de testar um número maior de amostras de *Acanthamoeba*, tanto para avaliar se haveria algum padrão no perfil de proteases de acordo com o genótipo ou procedência (clínica ou ambiental), quanto para testar se haveria mudança na produção de proteases após interação com células de cultivo.

### 3. OBJETIVOS

**3.1 Objetivo geral:** Comparar o perfil de proteases secretadas por *Acanthamoeba*, de origem clínica e ambiental, de diferentes genótipos, e avaliar se ocorre alterações nesse perfil após a interação com células de cultivo.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

- A. Avaliar o crescimento e efeito citopático de isolados de *Acanthamoeba*.
- B. Determinar o perfil de proteases secretadas de amostras de *Acanthamoeba* de diferentes genótipos, por ensaio eletroforético em gel de poliacrilamida copolimerizado com gelatina (zimografia).
- C. Quantificar a atividade dessas proteases secretadas em ensaio enzimático colorimétrico de azocaseína.
- D. Avaliar se a interação com células MDCK induz alterações no perfil de proteases secretadas das amostras de *Acanthamoeba*.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Amostras de *Acanthamoeba*

Culturas de *Acanthamoeba*, mantidas a 32° C em cultivo axênico, em meio PYG suplementado com Enrofloxacino 0,02 mg/mL e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (PYG completo) (**ANEXO I**), foram utilizadas nos experimentos. Os isolados foram selecionados para o estudo com base em sua origem, seus genótipos e características fisiológicas associadas a patogenicidade, conforme descrito na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Origem, genótipo e caracterização fisiológica parcial de isolados a serem utilizados nos experimentos

Cepa	Origem	Ano	Genótipo	Osmo e termotolerância*
ALX	Caso de ceratite Vitória-ES, Brasil	2006	T4/2	1 M / 42° C
LG	Caso de ceratite Vitória-ES, Brasil	2008	T4/13	1 M / 37° C
AR14	Poeira doméstica Vitória-ES, Brasil	2007	T4/16	1 M / 37° C
AR15	Poeira doméstica Vitória-ES, Brasil	2007	T11	0,5 M / 37° C
R2P5	Poeira doméstica - Vitória-ES, Brasil	2011	T1	Nr*
AP4	Água - Tuskegee AL,EUA (ATCC 30872)	1965	T2	Nr*

\* Avaliação realizada com as amostras em seu estado original de isolamento, em cultivo no meio ágar não nutrientes com bactérias (DUARTE et al, 2013).

Nr: não realizado. A cepa AP4 é considerada não patogênica por testes in vitro em estudos prévios (ROCHA-AZEVEDO et al 2007)

Os isolados ALX e LG, de casos de ceratite amebiana, e AR14 e AR15, de poeira de ambiente doméstico, foram obtidos em meio ágar soja e nessa condição, foram caracterizados pelos critérios fisiológicos de termo e osmotolerância. As culturas

usadas no presente estudo foram axenizadas entre 2007 e 2008 e são, portanto, amostras em cultivo axênico prolongado.

O isolado R2P5 também foi obtido em meio ágar soja, de poeira doméstica, sendo identificado como genótipo T1 por POSSAMAI (2012). Esse isolado foi axenizado em 2014 no Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia, UFMG.

A cepa de referência AP4 (ATCC 30872) apresenta característica de baixa patogenicidade, conforme estudo de ROCHA-AZEVEDO e SILVA-FILHO (2007). É uma cepa de origem ambiental isolada de água e identificada como genótipo T2 por DUARTE et al. (2013).

## **4.2 Curvas de crescimento**

Para avaliar a fase exponencial de crescimento, buscando determinar o ponto mais propício à obtenção do meio condicionado, foram realizadas curvas de crescimento com as culturas. Garrafas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, com 10 mL de meio PYG completo, foram inoculadas com 10<sup>5</sup> trofozoítos/mL, em duplicata. Os trofozoítos foram contados a cada 12 horas, retirando-se 10 µL da cultura homogeneizada e aplicando em Câmara de Neubauer, até se atingir 96 horas.

## **4.3 Determinação do efeito citopático**

Para complementar a caracterização do potencial patogênico dos isolados, foram realizados ensaios de efeito citopático sobre células MDCK (Madin Darby Canine Kidney) (ATCC CCL34). As células foram cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> em meio MEM suplementado com 5% de SFB e antibióticos penicilina, estreptomicina e fungizona, em ambiente a 37°C e com 5% de saturação de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, essas células foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e transferidas para placa de 24 poços, com cerca de 2 x 10<sup>5</sup> células por poço. Monocamada

confluentes de células se formou nos poços após 24 horas de incubação, em ambiente adequado. Trofozoítos de *Acanthamoeba* em fase exponencial de crescimento foram adicionados à monocamada, na proporção de 1:2 e incubados por 24 horas a 37 °C.

Após esse período, o sobrenadante de cada poço foi homogeneizado por aspiração, e retirado. As células remanescentes foram fixadas com formalina 10% por uma hora, e coradas com aproximadamente 2 mL de cristal violeta 1% por 20 minutos. O corante foi retirado, os poços analisados em microscópio invertido e fotodocumentados.

#### **4.4 Produção do meio condicionado para os ensaios de zimografia e azocaseína**

Para a produção do meio condicionado,  $10^7$  trofozoítos, em fase exponencial de crescimento (às 36 horas) foram transferidos para garrafas de cultivo com 5 mL de meio PYG sem SFB, e mantidos por 24 horas a 32°C. Três mililitros do sobrenadante foi coletado e centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos e filtrado em membrana de 0,22 µm estéril para assegurar a ausência de fragmentos celulares. O meio condicionado foi armazenado em alíquotas de 100 µL em freezer – 80°C até a utilização.

#### **4.5 Co-cultivo com células MDCK**

Para avaliar se o contato com células de cultivo poderia ocasionar alterações no perfil de proteases secretadas, os trofozoítos das culturas foram interagidos com células epiteliais MDCK (ATCC CCL34).

As células foram cultivadas conforme item 4.3, e os trofozoítos de *Acanthamoeba* adicionados à monocamada, na proporção de 1:2 e incubados por 24 horas a 37°C.

Após esse período, o sobrenadante de cada poço foi homogeneizado por aspiração, coletado e transferido a poços de outra placa, para uma nova incubação por 24 horas a 37°C. O processo foi repetido pela terceira vez, quando então o sobrenadante contendo trofozoítos foi coletado e transferido a garrafas de cultivo com meio PYG completo. Após o terceiro repique dos trofozoítos, o meio condicionado foi obtido conforme especificado no item 4.4.

Nos resultados dos ensaios de zimoografia e azocaseína, os isolados interagidos foram designados com a letra “i” antes de sua denominação (iALX, iAP4, iAR14, iAR15, iLG, iR2P5).

#### **4.6. Zimografia**

A avaliação do perfil de proteólise foi realizada conforme descrito por SOUZA-CARVALHO et. al., (2011), com algumas modificações. A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida 10% co-polimerizado com gelatina a 1 mg/mL, a 4°C. Cinco microlitros do meio condicionado foi diluído 1:1 com o tampão de carregamento e aplicado nas canaletas. Após a eletroforese, as proteínas foram renaturadas em solução 2 % de Triton X-100 (peso/volume) por 30 minutos, duas vezes, sob agitação. O gel foi incubado em tampão Tris 50 mM com CaCl<sub>2</sub> a 10 mM, pH 7,4 a 37°C, overnight. A coloração foi realizada com Azul de Comassie, permitindo a visualização de áreas não coradas correspondentes à digestão da gelatina pelas enzimas. Para determinar a natureza das enzimas proteolíticas, também foram realizadas eletroforeses após tratamento das amostras por 30 minutos, com PMSF a 1 mM e EDTA a 10 mM, inibidores de serino-protease e metaloprotease, respectivamente. As imagens dos géis foram obtidas através de escaneamento, e analisadas a partir do programa de edição de imagens IMAGEJ com a macro MolWt.

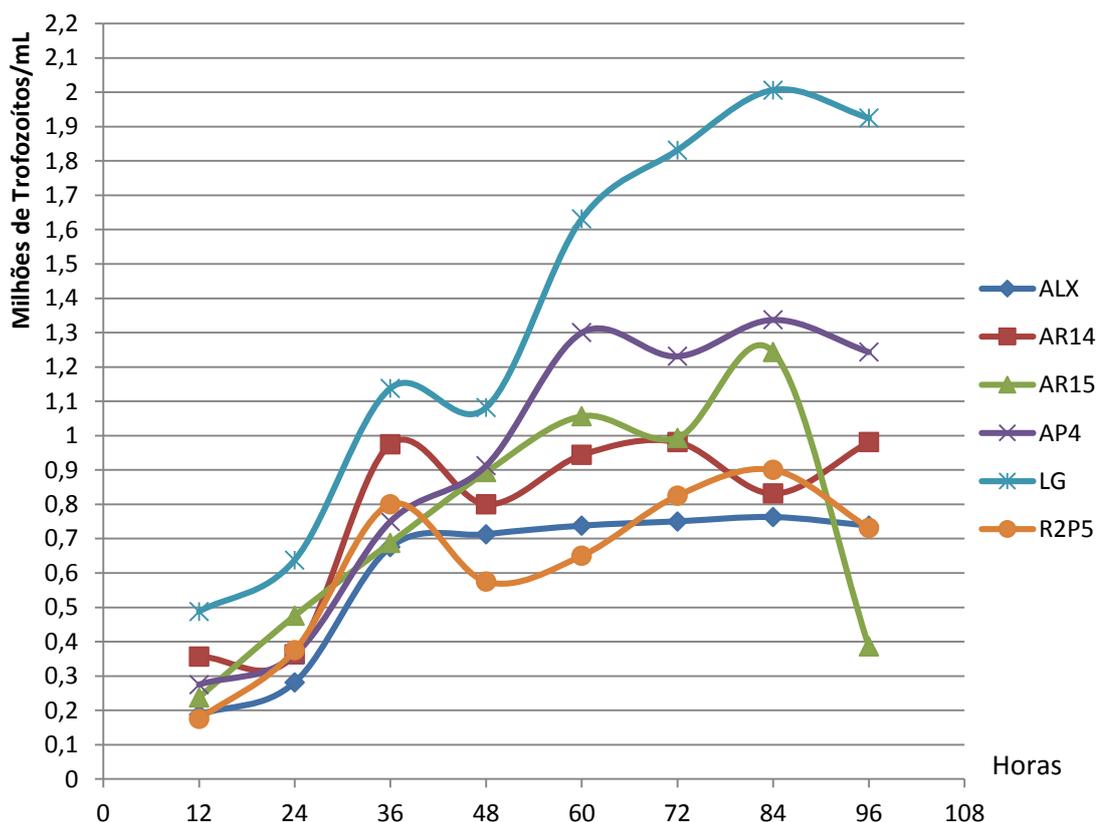
#### **4.7. Quantificação das proteases secretadas por ensaio colorimétrico**

A quantificação da atividade de proteases secretadas foi realizada conforme protocolo proposto por KHAN et al., (2000), com modificações. Amostras do meio condicionado, obtido conforme item 4.3, foram incubadas com azocaseína 2% na proporção 2:1 por 3 e 6 horas, a 37°C. Após interrupção da reação com Ácido Tricloroacético (TCA) a 10%, a mistura permaneceu em repouso por 15 minutos e foi centrifugada a 13.500 rpm por 15 minutos. Ao sobrenadante removido adicionou-se NaOH 1 M e, após agitação suave, a absorbância foi avaliada a 440 nm. A leitura de absorbância do sobrenadante em relação ao branco foi realizada em leitor de ELISA. A maior absorbância do sobrenadante em relação ao branco é devido a atividade proteolítica das proteases presentes no sobrenadante. Os valores foram obtidos em Unidade/mL (U/mL), a partir da definição de que 1 unidade de atividade enzimática corresponde a quantidade de enzima requerida para causar o aumento de 0,01 na absorbância, a 440nm sob as condições do ensaio. Os ensaios foram realizados em triplicata e o branco foi constituído de amostra inativada com TCA 10%. Amostras do meio condicionado incubadas com inibidores PMSF (1 mM) e EDTA (10 mM) por 30 minutos a temperatura ambiente foram corridas em paralelo. As médias dos valores da atividade de proteases foram comparadas em grupo e individualmente. A análise de variância de dois fatores (ANOVA Two-Way) foi utilizada para as análises dos grupos, realizada no Minitab versão 16.0. E para análise individual, o Teste T foi utilizado para os dados com distribuição normal, realizado no SPSS versão 13.0, e o Teste de Mann Whitney, para os dados que não apresentavam distribuição normal. A normalidade foi avaliada pelo Teste de Shapiro Wilk. Sendo considerado o valor de  $p < 0,05$  diferença significativa.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Perfil de crescimento dos isolados

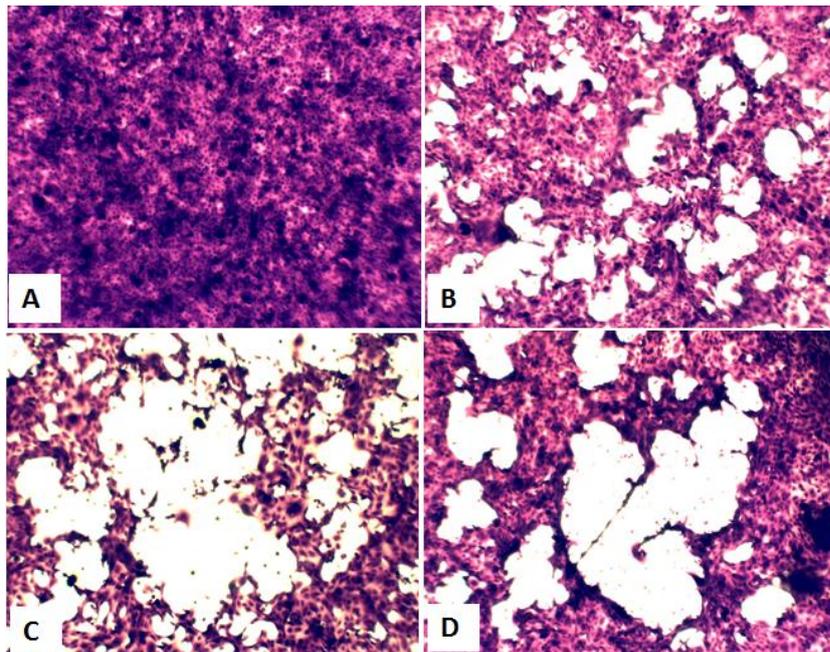
Conforme observado na **Figura 5**, o isolado que apresentou maior número de trofozoítos nos tempos avaliados foi o LG, enquanto que o isolado ALX apresentou menor quantidade de formas que os demais. Entre 24 e 48 horas, foi observada a tendência de crescimento exponencial da maioria dos isolados, exceto AR15 que apresentou crescimento linear. A partir de 48 horas, já é observado a fase estacionária para a maioria dos isolados, exceto LG.



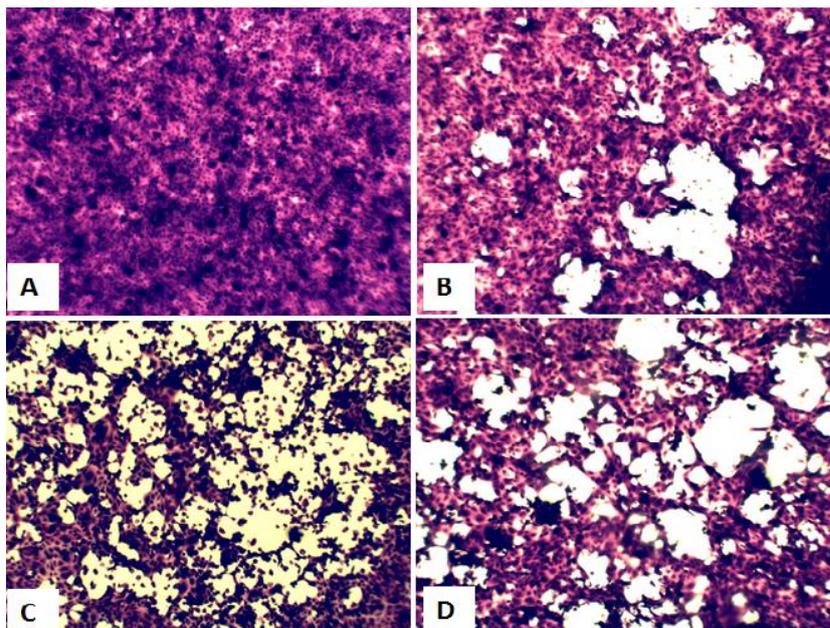
**Figura 5:** Curva de crescimento dos isolados, em cultivo axênico com meio PYG (proteose-peptona extrato de levedo completo (10% soro bovino fetal e 0,02 mg/mL enrofloxacino), com inóculo inicial de  $10^5$  trofozoítos/mL.

## 5.2. Efeito citopático

Todos os isolados apresentaram efeito citopático quando comparados ao controle de células, que não possuía trofozoítos (**Figura 6 e 7**). O aspecto microscópico indica a ocorrência de destacamento das células em alguns pontos, enquanto no controle a monocamada permaneceu intacta.



**Figura 6:** Efeito citopático dos isolados em monocamada de células MDCK. (A) Controle de célula. (B) isolado ALX. (C) Isolado AP4. (D) Isolado AR14. Aumento de 10x.



**Figura 7:** Efeito citopático dos isolados em monocamada de células MDCK. (A) Controle de célula. (B) Isolado AR15. (C) Isolado LG. (D) Isolado R2P5. Aumento de 10x.

### 5.3. Perfil de proteases secretadas em ensaio de zimografia

#### 5.3.1. Zimografia antes da interação com células MDCK

Quando utilizado o meio condicionado antes da interação com células MDCK, pode-se observar a presença de proteases de peso molecular variando de 170 a 58 kDa. O isolado ALX, AP4, AR14 e LG apresentaram proteases de 133 a 68 kDa (**Figura 8A-D**). Na canaleta correspondente a AR15, é possível visualizar apenas duas proteases de 76 e 58 kDa (**Figura 8E**). R2P5 apresentou uma protease de 170 kDa, e três proteases entre 119 e 73 kDa (**Figura 8F**).

A intensidade das áreas de digestão do isolado R2P5 foi superior aos demais isolados, demandando a diluição 1:10 da amostra original para que se observasse a separação nítida das bandas.

Nos ensaios de inibição, foi possível observar que não houve alteração do perfil de proteases da maioria dos isolados nas amostras incubadas com EDTA (**Figura 8B-E**). As proteases de 79 kDa, do isolado ALX, e de 68 kDa, do isolado AR14, foram inibidas pelo EDTA, entretanto também foram inibidas pelo PMSF (**Figura 8A-B**).

As proteases secretadas pelos isolados ALX, AP4, AR14 e AR15 foram totalmente inibidas pelo PMSF (**Figura 8A-B e 8D-E**). O isolado LG apresentou algumas proteases totalmente inibidas pelo PMSF, exceto a de 133 kDa. E uma protease de 85 kDa, peso molecular próximo as bandas visualizadas, foi detectada após a incubação com PMSF (**Figura 8C**). As três proteases entre 119 a 73 kDa do isolado R2P5 foram inibidas pelo PMSF, porém a de 170 kDa não sofreu inibição nem por esse nem pelo outro inibidor (EDTA) (**Figura 8F**).

### 5.3.2. Zimografia após interação com células MDCK

Após a interação com células MDCK, há uma modificação no perfil dos isolados, em que surgem proteases de menor peso molecular, entre 58 e 40 kDa, não visualizadas até então. No geral, os sinais de digestão apresentados menos intensos do que na condição pré-interação com células MDCK. Mesmo as proteases visíveis no gel anterior à interação também apresentam diminuição da sua intensidade. (**Figura 8G-L**). Novamente a amostra iR2P5 foi diluída 1:10, para melhor visualização das bandas correspondentes às proteases no gel.

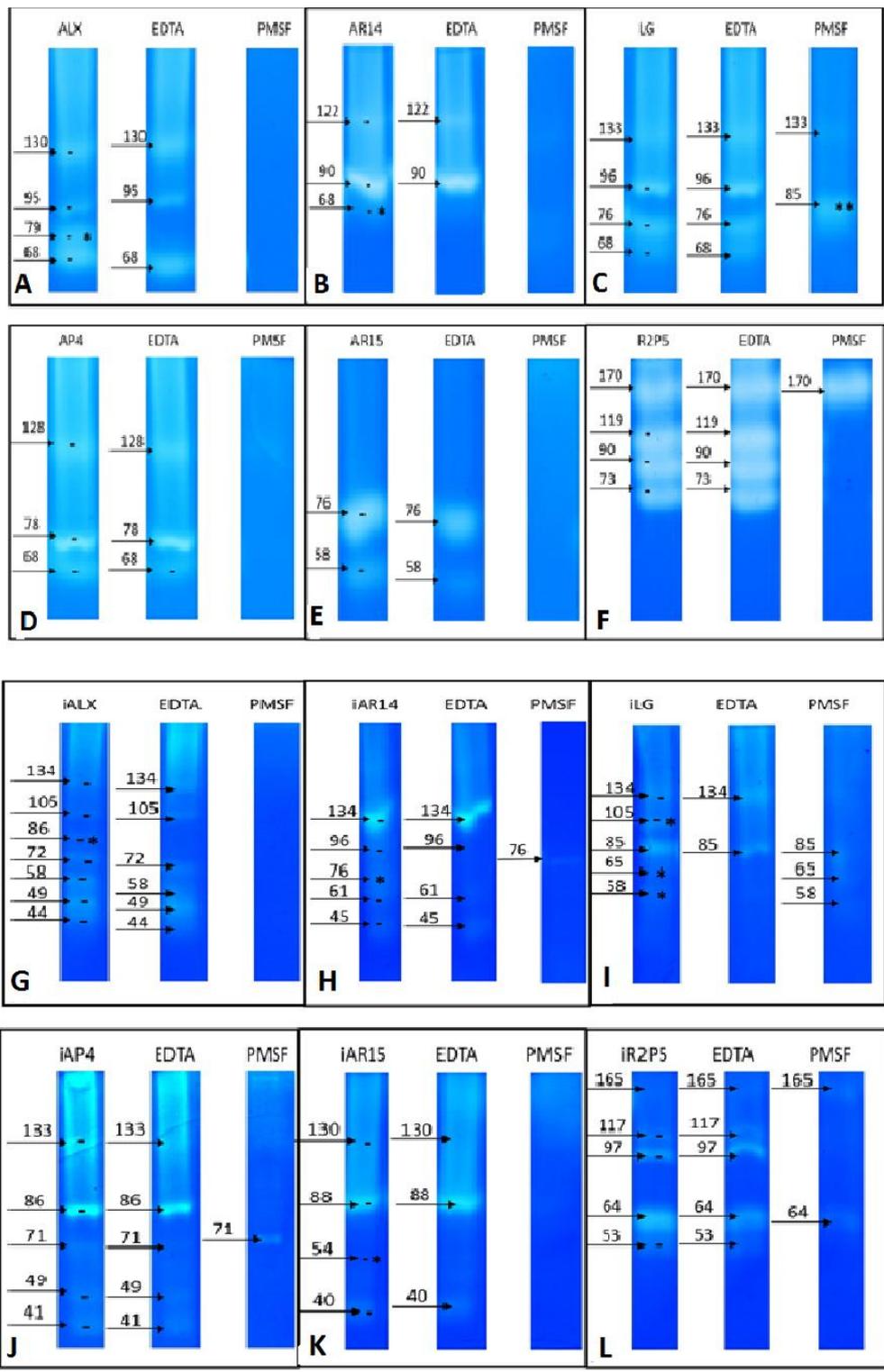
Também demonstrados na **Figura 8G-L**, os testes de inibição de proteases secretadas demonstraram a predominância de serinoproteases.

No perfil de proteases do isolado iALX é possível detectar sinais discretos de três proteases de baixo peso molecular, entre 58 e 44 kDa, não existentes na condição pré-interação. As proteases de 134 e 72 kDa são semelhantes ao perfil anterior. O EDTA inibiu a protease de 86 kDa e o PMSF inibiu todas as proteases (**Figura 8G**).

O isolado iAP4 apresentou novas proteases, com sinais discretos no gel, de 71, 49 e 41 kDa (não observadas na condição antes da interação) além de aparentemente manter as de 133 e 86 kDa. Não houve inibição de proteases pelo EDTA e o PMSF inibiu todas exceto a de 71kDa (**Figura 8J**).

O isolado iAR14 exibiu novas protease de 76 e 45 kDa, e manteve três proteases de peso molecular próximo ao perfil visualizado antes da interação com células MDCK, sendo elas de 134, 96 e 61 kDa. O EDTA inibiu totalmente a protease de 76 kDa, enquanto o PMSF inibiu as demais (**Figura 8H**).

O isolado iAR15 apresentou as proteases de 88 e 54 kDa, que se assemelham as já detectadas no perfil pré-interação. A protease de 130 kDa e a de 40 kDa não foram observadas anteriormente. Apenas a protease de 54 kDa sofreu inibição pelo EDTA e pelo PMSF, que também atuou sobre as demais proteases (**Figura 8K**).



**Figura 8:** Zimografia dos isolados de *Acanthamoeba* antes e após a interação com células MDCK em testes de inibição com inibidor de metaloprotease EDTA 10 mM e inibidor de serinoprotease PMSF 1 mM. As amostras de meio condicionado (5mL de PYG com  $10^6$  trofozoitos, mantidos a 32°C por 24 horas) foram aplicadas em gel de poliácridamida 10% copolimerizado com gelatina 1 mg/mL, na proporção 1:1 com tampão de carregamento, sendo a R2P5 diluída 1:10. (A) Isolado ALX. (B) Isolado AR14. (C) Isolado LG. (D) Isolado AP4. (E) Isolado AR15. (F) Isolado R2P5. (G) Isolado interagido ALX. (H) Isolado interagido AR14. (I) Isolado interagido LG. (J) Isolado interagido AP4. (K) Isolado interagido AR15. (L) Isolado interagido R2P5. O traço simples (-) indica banda inibida pelo PMSF; o asterisco simples (\*) indica banda inibida pelo EDTA e os asteriscos duplos (\*\*) indicam bandas que surgiram após o uso dos inibidores, e que portanto estavam ausentes na amostra original.

O isolado iLG apresentou, após a interação, proteases semelhantes ao perfil pré-interação, de 134 e 85 kDa. Houve o aparecimento de proteases de 105, 65 e 58 kDa, muito discretas, que desapareceram após a incubação com EDTA. A protease de 105 kDa também foi inibida pelo PMSF, juntamente com a de 134 kDa. Nenhum dos inibidores utilizados foi capaz de inibir a protease de 85 kDa (**Figura 8I**).

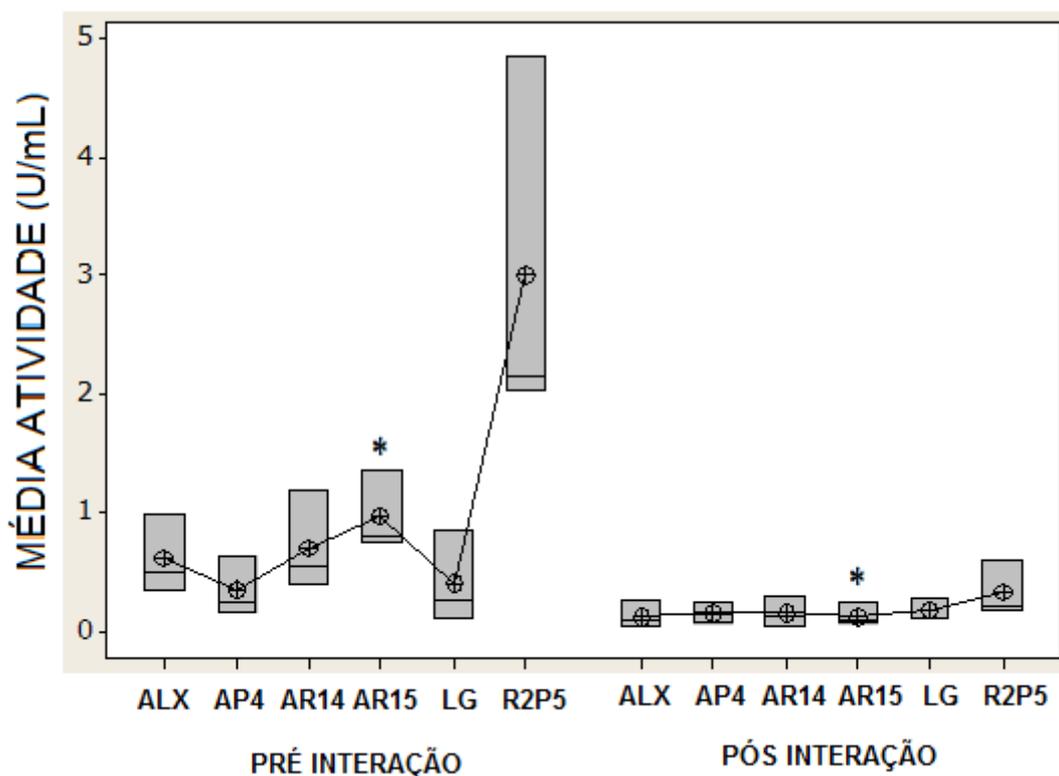
O isolado iR2P5, após a interação com células MDCK, apresentou proteases de 165, 117 e 97 kDa, semelhantes às caracterizadas no gel pré-interação, além das proteases de 64 e 53 kDa, não observadas anteriormente. O EDTA não causou inibição das proteases, porém o PMSF inibiu as proteases de 117, 97 e 53 kDa (**Figura 8L**).

#### **5.4. Ensaio de azocaseína**

A média dos valores de atividade das proteases secretadas (U/mL) por trofozoítos de *Acanthamoeba*, avaliado por ensaio de azocaseína, antes e após interação por 72 horas com células MDCK, incubadas ou não com inibidores PMSF (concentração final 1 mM) e EDTA (concentração final 10 mM) estão descritas no **ANEXO II**.

Ao comparar os dados das amostras agrupadas antes da interação com os dados das amostras agrupadas após a interação, sem a presença dos inibidores, houve uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) da atividade das proteases secretadas (**Figura 9**).

Individualmente, apenas o isolado AR15 apresentou diferença significativa quando comparadas as condições antes e após a interação ( $p < 0,05$ ) (**Figura 9**).

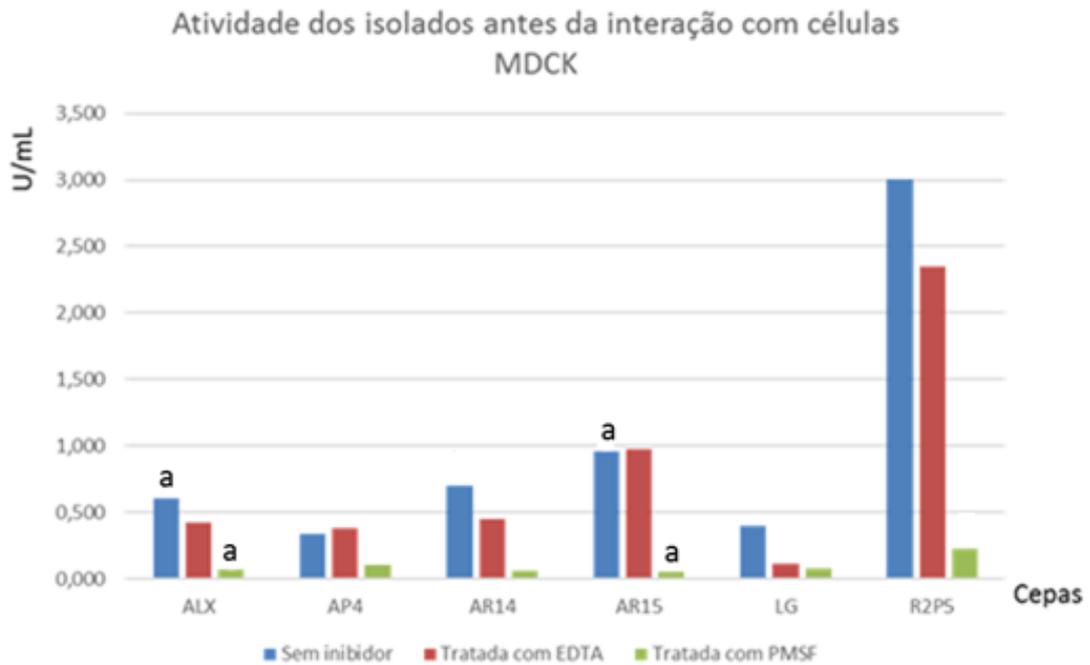


**Figura 9:** Comparação da atividade de proteases secretadas por trofozoítos de *Acanthamoeba* antes (PRÉ- INTERAÇÃO) e após (PÓS- INTERAÇÃO) com células MDCK. O asterisco (\*) corresponde a diferenças estatisticamente significativas avaliadas pelo teste ANOVA Two-Way e teste T.

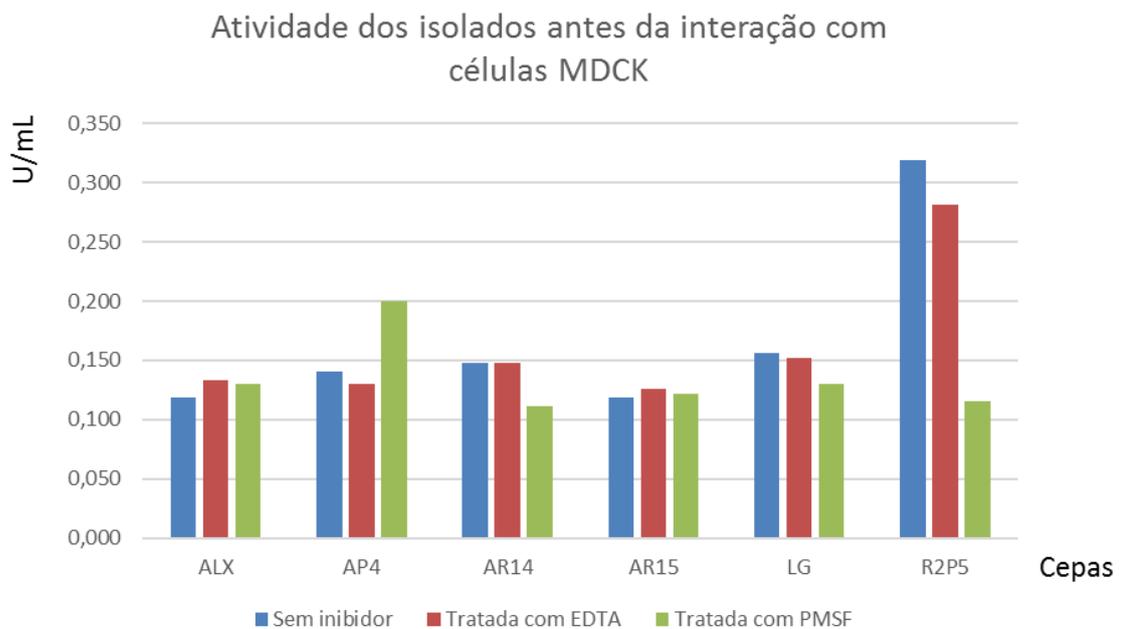
Considerando a condição das amostras antes da interação com células MDCK, os testes de inibição no ensaio de azocaseína indicaram que não houve diferenças significativas entre a atividade de proteases secretadas pelas amostras originais em relação àquelas incubadas com EDTA (**Figura 10**).

No teste de inibição com PMSF, o uso desse inibidor diminuiu significativamente a atividade das proteases secretadas pelos isolados AR15 e ALX ( $p < 0,05$ ), enquanto AR14 e R2P5 apresentaram apenas tendência de diminuição da atividade pelo inibidor ( $p < 0,1$ ) (**Figura 10**). Na comparação dos dados das amostras agrupadas, antes e após a interação, na presença do PMSF, houve uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) da atividade das proteases secretadas (dados não mostrados).

Os testes de inibição das amostras após interação com células MDCK não indicaram diferenças significativas das amostras originais em relação às tratadas com ambos inibidores (**Figura 11**).



**Figura 10:** Comparação da atividade de proteases secretadas por trofozoítos de *Acanthamoeba* antes da interação com células MDCK, nas condições “sem inibidor” (amostra original), “Tratada com EDTA” e “Tratada com PMSF” avaliadas pelo teste ANOVA Two-Way e teste T. (a) Valores com diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



**Figura 11:** Comparação da atividade de proteases secretadas por trofozoítos de *Acanthamoeba* após a interação com células MDCK, nas condições “sem inibidor”, “Tratada com PMSF” e “Tratada com EDTA” avaliadas pelo teste ANOVA Two-Way e teste T. Não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Perfil de Crescimento e Efeito Citopático

Para avaliar as proteases desses diferentes isolados, uma etapa importante foi avaliar o crescimento para uniformizar a obtenção dos trofozoítos, usados na produção do meio condicionado. Apesar de submetidas às mesmas condições laboratoriais, as culturas apresentaram variação no crescimento. Dentre os isolados de genótipo T4, considerado o mais patogênico, o isolado LG produziu o maior número de trofozoítos no período avaliado, enquanto o isolado ALX apresentou a menor produção se comparado aos demais. Ambos são isolados de caso clínico de CA, entretanto apresentaram perfis de crescimento diferentes.

OMAÑA-MOLINA e colaboradores (2013) obtiveram um achado semelhante ao avaliar os perfis de crescimento de duas cepas de genótipo T4, em que a de maior potencial de invasão dos tecidos, foi a de menor crescimento. Esse fato contraria a ideia de que o crescimento rápido poderia facilitar a infecção das células, ou estaria relacionado a patogenicidade, como afirma WALOCHNIK et al. (2000) e BECKER-FINCO et al. (2013).

Os isolados ambientais apresentaram perfis de crescimento semelhantes, apesar de pertencerem a genótipos diferentes. *Acanthamoeba* são espécies capazes de tolerar diferentes condições de crescimento. Isolados patogênicos e não patogênicos são capazes de crescer de maneira similar, em meio de cultura sem necessidades nutricionais especiais (SCHUSTER, 2002; HEREDERO-BERMEJO et al., 2012). Sendo assim, com base na literatura e nos achados desse experimento, o perfil de crescimento parece não ser um parâmetro adequado para inferir sobre o potencial patogênico e virulência dos isolados.

Entretanto, esse experimento foi importante para conhecer o perfil de crescimento dos isolados, como por exemplo o tempo para atingir a fase de crescimento exponencial, que é a fase de interesse para esse estudo. A partir disso, foi possível padronizar o tempo de cultivo para os isolados.

Um outro experimento realizado antes da caracterização das proteases, foi a determinação do efeito citopático dos isolados. Embora a maioria desses isolados tenham sido caracterizados quanto a seu potencial patogênico por critérios como termo e osmotolerância (ALX, AR14, AR15 e LG, DUARTE et al, 2013) ou outros parâmetros, incluindo efeito citopático (AP4, ROCHA-AZEVEDO e SILVA-FILHO, 2007), o isolado ambiental R2P5, de genótipo T1, ainda não foi caracterizado por nenhum critério. Os resultados indicaram que todos são capazes de causar lise de células MDCK, apresentando, portanto, citopatogenicidade.

Alguns estudos anteriores que empregam o efeito citopático para caracterizar isolados descrevem metodologia que avalia o grau de destruição por inspeção visual do poço, determinando de forma qualitativa ou semi-quantitativa as áreas não coradas, correspondentes ao dano celular causado pelos trofozoítos (KHAN et al, 2000, KHAN e TAREEN, 2003; ROCHA-AZEVEDO et al., 2009). Utilizando a inspeção visual do poço em nossos experimentos, não foi possível inferir sobre diferenças no grau de efeito citopático entre os isolados. As condições experimentais da interação foram a proporção aproximada de duas células para cada trofozoíto por 24 horas, similar ao usado por GONZALEZ-ROBLES et al. (2014). No entanto, outros autores descrevem uma proporção ameba/célula de 1:10 (LORENZO MORALES et al., 2015; WALOCHNIK et al., 2000), ou seja, número muito menor de amebas do que a utilizada em nossos experimentos. Portanto, é possível que com uma quantidade maior de amebas, a quantificação da destruição, entre um isolado e outro, seja difícil de determinar. O que se observa na literatura, é que não há uma padronização das condições para realização de experimentos de determinação de efeito citopático, havendo estudos com células HEp2, Vero, HBMEC (DE JONCKHEERE, 1980; BAUER et al., 1993; ALSAM et. al., 2005; KOESHLER, et al., 2009), com diferentes tempos de interação, que variam de poucas horas a um dia (ALFIERI et al., 2000; KHAN et al., 2000; GONZALEZ-ROBLES et al., 2006; SERRANO-LUNA et al., 2006; OMAÑA-MOLINA et al., 2013; GONZALEZ-ROBLES et al., 2014), além de diferentes formas de detectar o dano celular (KHAN et al., 2000; SERRANO-LUNA et al., 2006; OMAÑA-MOLINA et al., 2013; GONZALEZ-ROBLES et al., 2013). Dessa forma, torna-se necessário um estudo mais amplo sobre que condições seriam ideais para determinar o efeito citopático de isolados de *Acanthamoeba*, para avaliar sua virulência. No presente trabalho, pode-se concluir

que todos os isolados são capazes de causar efeito citopático em monocamada de células MDCK, confirmando seu potencial patogênico. Porém, nas condições experimentais usadas, não foi possível avaliar se há diferenças de virulência entre as amostras.

## **6.2. Proteases secretadas antes da interação com células MDCK**

Diversos estudos têm utilizado a técnica de zimografia para acessar o perfil de proteases produzidas por *Acanthamoeba*, tanto de proteases secretadas quanto somáticas (ALFIERI et al., 2000; KHAN et al, 2000; SERRANO-LUNA et al, 2006; SISSONS et al, 2006). Em alguns desses estudos são avaliadas diferentes condições, especialmente de pH, que tem influência no perfil de proteases observado devido a existência de algumas proteases com melhor atividade em determinado pH (ALFIERI et al, 2000; SERRANO-LUNA et al, 2006). Em nossos experimentos, para determinar uma condição única visando avaliar a produção de proteases antes e após interação com células MDCK, inicialmente foi realizada uma avaliação das condições da eletroforese, usando pHs 6,5, 7,0 e 7,5. Houve pouca diferença no perfil de proteases secretadas, que diferiram apenas em relação à intensidade das bandas (dados não mostrados). O pH 7,5 foi selecionado com base nessa avaliação e também levando em conta estudos prévios que indicaram maior atividade de proteases em pH próximo a neutralidade (MITRO et. al., 1994; ALFIERI et al., 2000; SERRANO-LUNA et al., 2006; SISSONS et al., 2006).

Outro parâmetro avaliado foi a temperatura de incubação do gel para a ação das proteases, após a eletroforese (dados não mostrados). Um estudo de SERRANO-LUNA e colaboradores (2006), constatou que a temperatura de incubação do gel da zimografia não é capaz de influenciar significativamente no perfil de degradação das proteases na poliacrilamida. Entretanto, também foi observado que na temperatura de 35°C, algumas proteases apresentavam maior atividade proteolítica, se comparado a outras temperaturas (20°C e 30°C) de incubação, nas mesmas condições de pH. Baseando-se nisso a temperatura escolhida para nossos

experimentos foi a de 37° C, que seria próxima da ideal para obter maior degradação do gel pelas proteases secretadas.

Em uma análise geral, antes da interação com células MDCK, os isolados apresentaram perfis diversificados de proteases secretadas. As serinoproteases foram predominantes, representando 85% das observadas, confirmando que essa classe constitui a mais frequente das proteases que são secretadas por *Acanthamoeba* (ALFIERI et al. 2000; KHAN et al. 2000; SERRANO-LUNA et al., 2006; SOUZA-CARVALHO et al., 2011; OMANA-MOLINA et al., 2013). Esses achados foram corroborados pelos resultados obtidos no ensaio enzimático de azocaseína, que é capaz de quantificar as proteases secretadas. Avaliando os dados agrupados (considerando todos os isolados) com e sem PMSF, foi observada diferença significativa na atividade das proteases. Na análise individual (isolado por isolado), foi detectada diminuição significativa de atividade das proteases de ALX e AR15, enquanto nos isolados AR14 e R2P5 foi perceptível uma tendência a diminuição, não confirmada estatisticamente, portanto.

Algumas proteases foram inibidas pelo EDTA e pelo PMSF, como por exemplo a de 79 kDa do isolado ALX e a de 68 kDa do isolado AR14 (**Figura 8A-B**). Observações similares foram realizadas por DUDLEY et al. (2008) e SOUZA-CARVALHO et al. (2011). Essas proteases são provavelmente serinoproteases dependentes de cálcio, cujo papel biológico parece estar associado ao processo de encistamento (DUDLEY et al. (2008). Serino e também cisteínoproteases são importantes devido a elevada atividade proteolítica, necessária para o processo autofágico que ocorre na fase inicial da formação do cisto (KOEHLER et al., 2009; LEITSCH, et al., 2010; MOON et al. (2011). Dessa forma, além de sua importância como fator de patogenicidade, (MITRO et al, 1994; KHAN et al, 2000; KOESHLER et al., 2009; SERRANO-LUNA et al., 2013), as proteases também são relevantes para a sobrevivência, multiplicação e transformação celular (DUDLEY et al. (2008).

Também foi observada uma protease de 170 kDa não inibida nem pelo EDTA e nem pelo PMSF, no isolado R2P5 (**Figura 8F**). Considerando que as principais classes de proteases encontradas em *Acanthamoeba* são serino, metalo e cisteinoproteases (KHAN et al., 2000; NA et al., 2001; KHAN, 2006; KHAN, 2009; SOUZA-CARVALHO et al., 2011; LORENZO-MORALES et al., 2013), essa protease de 170 kDa é

provavelmente uma cisteínoprotease. Para complementar nosso estudo e confirmar a natureza dessa protease, seria necessário utilizar um inibidor específico de cisteínoprotease, como por exemplo o inibidor E-64.

Uma protease de 85 kDa, no isolado LG, (**Figura 8C**), surgiu após a incubação da amostra com PMSF. Pode se tratar de uma metaloprotease que foi inicialmente mascarada na canaleta que contém o meio condicionado do isolado sem inibidores, por existir, próxima a ela, serinoproteases de peso molecular semelhantes (96 e 76 kDa). Uma metaloprotease de aproximadamente 80 kDa já foi descrita para *Acanthamoeba*, e tem sua secreção induzida pela adesão do protozoário às células hospedeiras (CAO et al., 1998; KHAN, 2006; LEE et al., 2015), o que pode ser aplicado à amostra LG que foi isolada de caso clínico.

As massas moleculares das proteases dos isolados desse estudo variaram de 58 a 170 kDa, e são semelhantes as proteases observadas em demais estudos na literatura (MITRO et al., 1994; LEHER et al., 1998; ALFIERI et al., 2000; KHAN et al., 2000; NA et al., 2001; SERRANO-LUNA et al., 2006; SOUZA-CARVALHO et al., 2011).

Nos isolado ALX, AR14 e LG, são visualizadas uma serinoprotease de 68 kDa, que parece ser similar à de 66 kDa, apontada como característica de genótipo T4 por MITRO e colaboradores (1998). Os isolados ALX e LG apresentaram serinoproteases de 79 e 76 kDa, respectivamente, semelhante a protease de 75 kDa visualizada por ALFIERI et al. (2000), e 95 e 96 kDa, respectivamente, semelhante a protease de 97 kDa visualizada por CAO et al. (1998).

ALFIERI et al. (2000) também descreve serinoproteases de peso molecular maior que 110 kDa, que em nosso estudo são detectadas nos isolados ALX (130 kDa) e AR14 (122 kDa). Uma outra protease de 130 kDa está presente no isolado LG, que por não ser inibida pelos inibidores usados no estudo, acredita-se ser uma cisteinoprotease, já descrita em genótipo T4 por HADAS e MAZUR (1993) e ALFIERI et al. (2000). A serinoprotease de 85 kDa presente no isolado AR14, é similar à descrita anteriormente em um isolado de genótipo T4, por SISSONS et al. (2006).

Atualmente, na literatura, os estudos envolvendo *Acanthamoeba* de genótipo T2 e T11 são basicamente de isolamento e caracterização de amostras do ambiente, ou

de casos clínicos (LORENZO-MORALES et al., 2005; MAGHSOOD et al., 2005; DUARTE et al., 2013; NIYYATI e REZAEIAN, 2015). Os dois genótipos de *Acanthamoeba* têm sido identificados em casos de CA (KHAN et al., 2002; MAGHSOOD et al., 2005; RISLER et al., 2013; MASCHIO et al., 2015), enquanto em EAG apenas o genótipo T2 já foi relatado (WALOCHNIK et al., 2008; WALOCHNIK et al., 2015). Entretanto, admite-se que o isolamento desses genótipos em casos clínicos é raro (PUMIDONMING et al., 2014).

O isolado de genótipo T2 (AP4) é a cepa ATCC 30872, classificada como não patogênica (ROCHA-AZEVEDO e SILVA-FILHO, 2007). Esses autores descreveram duas proteases secretadas, entre 30 e 25 kDa, por esse genótipo, não observadas nos nossos experimentos. No entanto, os pesquisadores realizaram a zimografia em pH 5,5, diferentes das nossas condições (pH 7,5). Essa diferença, portanto, pode ser atribuída aos diferentes pHs em que os experimentos foram realizados, conforme tem sido demonstrado por outros trabalhos (ALFIERI et al., 2000; SERRANO-LUNA et al., 2006). Em nosso estudo, através da zimografia em pH 7,5, percebemos que esse isolado secreta serinoproteases de 128, 78 e 68 kDa.

Quanto ao isolado de genótipo T11, nenhum trabalho descreve caracterização de perfil de protease secretadas até então. Observamos duas serinoproteases de 76 e 58 kDa para esse isolados, sendo as primeiras a serem descritas para o genótipo T11 na literatura.

Em genótipo T1, a literatura descreve uma serinoprotease de 130 kDa e uma metaloprotease de 150 kDa como responsáveis pela patogenicidade de isolado de caso clínico. A serinoprotease seria capaz de se ligar a receptores celulares do hospedeiro e alterar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, facilitando a entrada do protozoário. O papel da metaloprotease na patogênese da EAG, não é bem definido. Sabe-se que ela é capaz de degradar matriz extracelular, entretanto não é responsável pelas alterações celulares para invasão do hospedeiro, acredita-se que pode desempenhar alguma função após a invasão do sistema nervoso central (ALSAM et al., 2005; SISSONS et al., 2006). Em nosso estudo, não foi detectada metaloprotease no isolado de genótipo T1 (R2P5), provavelmente devido às condições em que foi feita a zimografia (pH 7,5), que pode não ser favorável à expressão de sua atividade (SERRANO-LUNA et al., 2006). Uma possível

cisteínoprotease de 170 kDa foi visualizada. Cisteinoproteases ainda não foram descritas para isolados de genótipo T1 e, portanto, esse é primeiro relato de uma possível cisteínoprotease no genótipo. Três serinoproteases também foram detectadas (119, 90 e 73 kDa), sendo que a primeira é semelhante à de 130 kDa relatada na literatura (ALSAM et al., 2005; SISSONS et al., 2006).

Além disso, o isolado R2P5 precisou ser diluído em 1:10 com tampão de corrida, para ser visível seu perfil de proteases no gel de poliacrilamida. Através da análise quantitativa pelo ensaio enzimático de azocaseína, foi possível determinar que a atividade das proteases do isolado R2P5 é de 3 a 9 vezes maior, se comparada aos demais isolados, antes da interação com células MDCK (dados não mostrados). Apesar de não ser mencionado nos estudos que abrangem genótipo T1 de *Acanthamoeba*, disponíveis na literatura (ALSAM et al., 2005; SISSONS et al., 2006), a secreção de proteases por esse genótipo é notadamente maior. ROCHA-AZEVEDO e SILVA-FILHO (2007) associa uma maior atividade proteolítica ao maior potencial patogênico do isolado. Ensaio quantitativos adicionais devem ser realizados para comprovar essa observação, antes e após a interação com células MDCK, seguidos de análise estatística.

Em resumo, antes da interação com células MDCK, os isolados secretam predominantemente serinoproteases, achado confirmado pela zimografia, pelo ensaio colorimétrico e pela literatura (ALFIERI et al. 2000; KHAN et al. 2000; SERRANO-LUNA et al., 2006). A complexidade dos perfis de proteases secretadas, dificulta a sua associação direta com o genótipo de cada isolado. Embora haja algumas proteases que parecem ser específicas de certos genótipos, uma conclusão definitiva sobre certas proteases como marcadores associados a genótipos demandaria um estudo mais amplo. A quantidade de serinoproteases, de peso molecular variável, atualmente é inexplicável (KHAN, 2006). Mas essa diversidade pode ser análoga às cisteinoproteases de *Entamoeba histolytica*, em que algumas são simplesmente precursores para amadurecer outras enzimas (QUE et al., 2002).

### 6.3. Interação com células MDCK altera o perfil de proteases

A complexidade do perfil de proteases secretadas por *Acanthamoeba* também pode ser atestada pelos resultados obtidos na zimografia após interação com células MDCK. Não apenas houve uma alteração no perfil de proteases secretadas, sendo visível uma maior diversidade de proteases, como também houve uma diminuição quantitativa dessas, visível pela diminuição da intensidade das bandas no gel de zimografia.

Esses resultados não corroboraram com o observado no trabalho de KOESHLER et al. (2009), em que uma cepa de *Acanthamoeba* foi interagida com células HEp2 e avaliada antes e após esse processo, por ensaio de zimografia. Os autores observaram as mesmas proteases nas duas condições, porém após a interação houve significativo aumento da produção. Os dados quantitativos do presente trabalho, avaliados por ensaio de azocaseína, indicaram diminuição significativa da produção de proteases quando avaliados os dados agrupados, e na avaliação individual ficou claro que não houve aumento da produção de proteases após a interação (**Figura 9**). Mas, segundo a literatura, a diminuição da quantidade de proteases secretadas não está diretamente relacionada a sua capacidade proteolítica. SOUZA-CARVALHO et al. (2011) descobriu que as proteases secretadas por trofozoítos de *Acanthamoeba* tem potencial de degradar substratos de gelatina e de colágeno em baixas concentrações.

Proteases anteriormente observadas deixaram de ser expressas após a interação com células MDCK, as que continuaram a ser expressas foram principalmente serinoproteases. Proteases de baixo peso molecular (< 60kDa) foram secretadas por todos os isolados. Houve também o aparecimento de metaloproteases, classe não identificada no perfil pré-interação, e o aumento da secreção de possíveis cisteínoproteases e serinoproteases dependente de cálcio.

Proteases de baixo peso molecular estão associadas a piores manifestações clínicas de ceratite, segundo SOUZA-CARVALHO et al., 2011. Além disso, a literatura apresenta serinoproteases de 40 kDa capazes de degradar matriz extracelular (MITRA et. al., 1995), e de 42 kDa capaz de degradar imunoglobulinas,

inibidores de proteases e IL-1 (CHO et al., 2000). Serinoproteases de peso molecular semelhante aos citados foram visualizados nos isolados ALX, AP4, AR14 e AR15 após a interação com células MDCK. Os isolados LG e R2P5 apresentaram serinoproteases de 58 e 53 kDa, respectivamente. É possível que essas proteases sejam semelhantes às dos demais isolados, uma vez que a comparação das proteases secretadas, na zimografia, é complicada pela baixa precisão na determinação do peso molecular das proteínas no gel de poliacrilamida (SERRANO-LUNA et al., 2006).

Em todos os isolados desse estudo, exceto o isolado R2P5 que é correlacionado a encefalite em alguns estudos (ALSAM et al., 2005; SISSONS et al., 2006), foi possível detectar uma serinoprotease de aproximadamente 133 kDa, descrita na literatura como MIP-133. Essa protease é secretada por cepas virulentas de *Acanthamoeba*, e possui correlação direta com a patogênese da CA. O trauma produzido na superfície da córnea, causado pelo desgaste promovido pela lente de contato, torna o epitélio mais suscetíveis a ligação dos trofozoítos, isso induz a produção de maiores quantidades da protease MIP133. Além disso, as lentes de contato podem adquirir biofilmes e depósitos de proteínas, que estimulam os trofozoítos a produzir quantidades aumentadas dessa protease e criam infecções mais graves da córnea. A MIP-133 é capaz de induzir a apoptose das células epiteliais e a degradação da matriz de colágeno presentes na córnea (LEHER et al., 1998; HURT et al., 2003a; HURT et al., 2003b; ALIZADEH et al., 2005; GARATE et al., 2004; GARATE et al., 2005).

O isolado R2P5 precisou novamente ser diluído em 1:10 com tampão de corrida, para que seu perfil de proteases fosse visível no gel de poliacrilamida. O aumento da atividade enzimática persistiu após a interação com células MDCK, sendo de 2 a 3 vezes maior que os demais isolados. Esse achado foi confirmado pelo ensaio quantitativo, mesmo havendo diminuição da produção de protease por todos os isolados.

Uma possível explicação para a alteração do perfil de proteases secretadas após a interação com células MDCK é a sua modulação de acordo com as condições de cultivo, ao qual os isolados estavam submetidos. Em cultivo axênico, com meio PYG completo, os isolados modulavam a secreção de proteases que seriam necessárias

para o desenvolvimento de funções fisiológicas de alimentação e reprodução nesse ambiente, ou seja, compatíveis com os nutrientes presentes no meio PYG. Ao ser submetida a interação com células MDCK, as condições de cultivo se modificam, e há sinalização para produção de outros tipos de proteases capazes de promover a sobrevivência do trofozoíto no meio, o que justifica a diversidade de proteases produzidas e a baixa quantidade. Essa hipótese poderia ser confirmada após mais repiques de trofozoítos com células MDCK e avaliação das proteases secretadas. Essa modulação seria um mecanismo importante para *Acanthamoeba* se adaptar às condições do ambiente ou ao parasitismo, quando tem a oportunidade de contato com o hospedeiro.

#### **6.4. Perspectivas**

Apesar do nosso estudo não ter demonstrado uma correlação direta entre as proteases secretadas e o potencial patogênico dos isolados, é evidente que as proteases desempenham papel importante para a sobrevivência e patogenicidade da *Acanthamoeba*. Os estudos que visam descobrir os mecanismos precisos do modo de ação das proteases, a nível molecular, estão apenas começando a emergir (SIDDIQUI e KHAN, 2012). A literatura ainda carece de estudos que abordem a caracterização de proteases após a interação com células de cultivo, e a avaliação de seu papel na virulência dos genótipos, por meio de ensaios *in vivo* e *in vitro*. Os estudos envolvendo esses aspectos, existentes na literatura, são limitados a determinados genótipos, geralmente T4, sendo que poderiam ser realizados com outros genótipos, inclusive os que ainda não tem seu perfil de protease descrito, como os mostrados nesse trabalho.

Outro importante aspecto a ser avaliado é a padronização das condições dos ensaios para determinação de efeito citopático, nos quesitos de quantidade e proporção de células e trofozoítos utilizados, como também de técnicas quantitativas confiáveis para avaliar diferenças no grau de patogenicidade.

E enfim, a zimografia, embora seja uma técnica que forneça informações importantes sobre comportamento biológico de *Acanthamoeba*, é limitada em termos de determinação molecular específica das proteases. Atualmente, uma outra abordagem mais robusta é a análise proteômica, como a técnica de eletroforese 2D seguida de identificação das proteínas por espectrometria de massa. Nessa técnica é realizada a separação das proteínas por carga isoeletrica e massa molecular, com posterior identificação de sua identidade por comparação com banco de dados.

As proteases de *Acanthamoeba* apresentam grande potencial para serem marcadores diagnósticos e alvos terapêuticos de drogas inibidoras, como já ocorre no tratamento de patologias como o câncer, dentre outros (LORENZO-MORALES et al., 2015). Estudos futuros poderão determinar o papel de proteases como alvos de vacinas, procurar novos inibidores em pesquisas nas bibliotecas químicas ou pelo desenvolvimento racional de medicamentos (SIDDIQUI e KHAN, 2012; LORENZO-MORALES et al., 2015).

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A variação do perfil de crescimento dos isolados do presente estudo e a divergência de dados obtidos na literatura, indicam que o crescimento em cultivo não é um parâmetro adequado para inferir sobre patogenicidade dos isolados.
- Nas condições experimentais realizadas, todos os isolados mostraram efeito citopático, indicando o potencial patogênico mesmo em genótipos considerados não patogênicos em relatos prévios da literatura.
- A complexidade do perfil de proteases secretadas, entre os diferentes isolados na condição pré interação com células MDCK, não permitiu uma correlação direta desse parâmetro com seu genótipo ou origem (clínica ou ambiental).
- Nesse trabalho, pela primeira vez foi descrito o perfil de proteases secretadas por *Acanthamoeba* de genótipo T11 e uma provável cisteínoprotease de alto peso molecular para o genótipo T1.

## 8. CONCLUSÃO

A interação com células MDCK induz alteração no perfil de proteases secretadas pelos isolados, com o aparecimento de proteases que podem estar relacionadas ao processo invasivo, indicando que *Acanthamoeba* apresenta mecanismos adaptativos para sua sobrevivência como parasita.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.B.; FARMER, M.A.; ANDERSEN, R.A.; ANDERSON, O.R.; BARTA, J.R.; BOWSER, S.S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R.A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T.Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C.E.; LEWIS, L.A.; LODGE, J.; LYNN, D.H.; MANN, D.G.; MCCOURT, R.M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP; MOZLEY-STANDRIDGE, S.E.; NERAD, T.A.; SHEARER, C.A.; SMIRNOV, A.V.; SPIEGEL, F.W.; TAYLOR, M.F.J. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. **J. Eukaryot. Microbiol.** v.52, p.399-451, 2005.

ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.B.; LANE, C.E.; LUKES, J.; BASS, D.; BOWSER, S.S.; BROWN, M.W.; BURKI, F.; DUNTHORN, M.; HAMPL, V.; HEISS, A.; HOPPENRATH, M.; LARA, E.; GALL, L.L.; LYNN, D.H.; MCMANUS, H.; MITCHELL, E.A.D.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.E.; PARFREY, L.W.; PAWLOWSKI, J.; RUECKERT, S.; SHADWICK, L.; SCHOCH, C.L.; SMIRNOV, A.; SPIEGEL, F.W. The Revised Classification of Eukaryotes. **J. Eukaryot. Microbiol.** v.59 n.5, p.429-493, 2012.

ALFIERI, S.C.; CORREIA, C.E.B.; MOTEGI, A.S.; PRAL, E.M.F. Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **J. Parasitol.** v.86 n.2, p.220–227, 2000.

ALIZADEH, H.; NEELAM, S.; HURT, M.; NIEDERKORN, J.Y. Role of contact lens wear, bacterial flora, and mannose-induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis. **Infection and Immunity.** v.73 n.2, p.1061-1068, 2005.

ALSAM, S.; KIM, K.S.; STINS, M.; RIVAS, A.O.; SISSONS, J.; KHAN, N.A. *Acanthamoeba* interactions with human brain microvascular endothelial cells. **Microb Pathog.** v.35 n.6, p.235-241, 2003.

ALSAM, S.; SISSONS, J.; JAYASEKERA, S.; KHAN, N.A. 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.** v.51, p.150-156, 2005.

ALVARENGA, L.S.; FREITAS, D.; HOFLING-LIMA, A.L. Ceratite por *Acanthamoeba*. **Arq. Bras. Oftal.** v.63 n.2, p.155-159, 2000.

AWWAD, S.T.; HEILMAN, M.; HOGAN, R.N.; PARMAR, D.N.; PETROLL, W.M.; MCCULLEY, J.P.; CAVANAGH, H.D. Severe reactive ischemic posterior segment inflammation in *Acanthamoeba* keratitis: a new potentially blinding syndrome. **Ophthalmology**. v.114 n.2, p.313-20, 2007.

BACON, A.S.; FRAZER, D.G.; DART, J.K.; MATHESON, M.; FICKER, L.A.; WRIGHT, P. A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984-1992. **Eye (Lond)**. v.7 n.6, p.719-725, 1993.

BAUER, R.W.; HARRISON, L.R.; WATSON, C.W.; STYER, E.L.; CHAPMAN, W.L.J. Isolation of *Acanthamoeba* sp. from a greyhound with pneumonia and granulomatous amebic encephalitis. **J Vet Diagn Invest**. v.5 n.3, p.386-391, 1993.

BECKER-FINCO, A.; COSTA, A.O.; SILVA, S.K.; RAMADA, J. S.; FURST, C.; STINGHEN, A. E.; FIGUEIREDO, B.C.; DE MOURA, J.; ALVARENGA, L. M. Physiological, morphological, and immunochemical parameters used for the characterization of clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*. **Parasitology** v.140, p.396–405, 2013.

BOOTON, G.C.; VISVESVARA, G.S.; BYERS, T.J.; KELLY, D.J.; FUERST, P.A. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. **Journal of Clinical Microbiology** v.43, p.1689-1693, 2005.

BOURCIER, T.; THOMAS, F.; BORDERIE, V.; CHAUMEIL, C.; LAROCHE, L. Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. **Br J Ophthalmol**. v.87 n.7, p.834-838, 2003.

BOWERS, B.; KORN, E.D. Cytochemical identification of phosphatase activity in the contractile vacuole of *Acanthamoeba castellanii*. **J Cell Biol**. V.59, p.784-91, 1973.

CALIXTO, P.H.M.; TRINDADE, F.R.; BALLARINI, A.J.; DIAS, C.A.G.M.; CAMPOS, C.E.C.; OLIVEIRA, J.C.S. Aspectos biológicos das principais amebas de vida-livre de importância médica. **Biota Amazônia**. v.4 n.2, p.124-129, 2014.

CAMPOS, R.; GOMES, M.C.O.; PRIGENZI, L.S.; STECCA, J. Meningoencefalite por ameba de vida livre. Apresentação do primeiro caso latino-americano. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v.19: 349-351, 1977.

CAO, Z.; JEFFERSON, M.D.; PANJWANI, N. Role of carbohydrate mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. **J Biol Chem.** v.273, p.15838-15845, 1998.

CARLESSO, A.M. et al. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.40 n.3, p.316-320, 2007.

CARLESSO A.M.; ARTUSO, G.L.; CAUMO, K.; ROTT, M.B. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. **Curr Microbiol.** v.60 n.3, p.185-190, 2010.

CARVALHO, F.R.S.; FORONDA, A.S.; MANNIS, M.J.; HOFLING-LIMA, A.L.; BELFORT, R.; FREITAS, D. Twenty Years of *Acanthamoeba* Keratitis. **Cornea.** v.28, p.516-519, 2009.

CHO, J.H.; NA, B.K.; KIM, T.S.; SONG C.Y. Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. **IUBMB Life** v.50, p.209-214, 2000.

CLARKE, D.W.; NIEDERKORN, J.Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Parasitology.** v.22 n.4, p.175-180, 2006.

CORLISS, J.O. Protozoan taxonomy and systematics. **Encyclopedia of life sciences Nature Publishing Group.** 2001.

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

CULBERTSON, C.H.; SMITH, J.W.; MINNER, H. *Acanthamoebae*: observations on animal Pathogenicity. **Science.** v.127, p.1506, 1958.

CULBERTSON, C.G.; SMITH, J.W.; COEHN, H.K. & MINNER, J.R. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. **Am. J. Path.** v.35, p.185, 1959.

CURSONS, R.T.M.; BROWN, T.J.; KEYS, E.A. Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic condition. **Applied and Environmental Microbiology**, v.40, n.1, p.62-66, 1980.

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

DEBBASCH, C.; CHAUMEIL, C.; BATELLIER, L.; SCAT, Y. Étude rétrospective sur deux ans de 344 patients ayant consulté pour une lésion cornéenne et chez lesquels une recherche d'amibes libres a été effectuée. **J Fr Ophthalmol.** v.22, p.848-852, 1999.

DOUGHERTY, P. J.; BINDER, P. S.; MONDINO, B. J.; GLASGOW, B. J. *Acanthamoeba* sclerokeratitis. **Am. J. Ophthalmol.** v.117 p.475–479, 1994.

DUARTE, J.L.; FURST, C.; KLISIEWICZ, D.R.; KLASSEN, G.; COSTA, A.O. Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. **Experim. Parasitol.** in press. 2013.

DUDLEY, R.; ALSAM, S.; KHAN, N.A. The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. **FEMS Microbiol Lett.** v.286, p. 9-15, 2008.

FORONDA, A.S. Crescimento de amebas de vida livre em meios semeados com líquido cefalorraquidiano humano (nota prévia). **Rev. Paul. Med.** n.87, p.140, 1976.

FREITAS, D.; JUNIOR, R.B.; FORONDA, A.S. Contribuição ao estudo da suscetibilidade de *Acanthamoeba* spp a diferentes métodos de desinfecção de lentes de contacto gelatinosas. **Arq Bras Oftalmol.** v.52 p.13-23, 1989.

GARATE, M; CAO, Z; BATEMAN, E; PANJWANI, N. Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. *J Biol Chem*. v.279 p.29849-29856, 2004.

GARATE, M.; CUBILLOS, I.; MARCHANT, J.; PANJWANI, N. Biochemical characterization and functional studies of *Acanthamoeba* mannose-binding protein. **Infection and Immunity**. v.73 n.9, p.5775-5781, 2005.

GELMAN, B.B.; RAUF, S.J.; NADER R.; POPOV V.; BOKOWSKI, J.; CHALJUB G.; NAUTA, H.W.; VISVESVARA, G.S. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. **JAMA**. v.285, p.2450-2451, 2001.

GONZALEZ-ROBLES, A.; CASTAÑÓN, G.; CRISTÓBAL-RAMOS, A.R.; OMAÑA-MOLINA, M.; BONILLA, P.; MARTÍNEZ-PALOMO, A.; *Acanthamoeba castellanii*: structural basis of the cytopathic mechanisms. **Experimental Parasitology**. v.114 n.3, p.133-140, 2006.

GONZALEZ-ROBLES, A.; SALAZAR-VILLATORO, L.; OMAÑA-MOLINA, M.; LORENZO-MORALES, MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Acanthamoeba royreba*: morphological features and in vitro cytopathic effect. *Experimental Parasitology*. v.133 n.4 p.369-375, 2013.

GONZALEZ-ROBLES, A.; SALAZAR-VILLATORO, L.; OMAÑA-MOLINA, M.; REYES-BATLLE, M.; MARTÍN-NAVARRO, C.M.; LORENZO-MORALES, J. Morphological features and in vitro cytopathic effect of *Acanthamoeba griffin* trophozoites isolated from a clinical case. **Journal of Parasitology Research**. 2014.

GULLETT, J.; MILLS, J.; HADLEY, K.; PODEMSKI, B.; PITTS, L.; GELBER, R. Disseminated granulomatous *Acanthamoeba* infection presenting as an unusual skin lesion. **Am. J. Med**. v.67, p.891-896, 1979.

HE, Y.G.; NIEDERKORN, J.Y.; MCCULLEY, J.P.; STEWART, G.L.; MEYER, D.R.; SILVANY, R.; DOUGHERTY, J. In vivo and in vitro collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v.1 n.11 p.2235-40, 1990.

HEREDERO-BERMEJO, I.; MARTIN, C.S.J.; CARRANZA, J.S. COPA-PATIÑO, J.L.; PÉREZ-SERRANO, J. *Acanthamoeba castellanii*: in vitro UAH-T17c3 trophozoite growth study in different culture media. **Parasitology Research** v.110 p.2563–2567, 2012.

HONG, Y. C.; HWANG, M.Y.; YUN, H.C.; YU, H.S.; KONG, H.H.; YONG, T.S.; CHUNG, D.I. Isolation and characterization of a cDNA encoding a mammalian cathepsin L-like cysteine proteinase from *Acanthamoeba healyi*. **Korean J. Parasitol.** v.40 p.17-24, 2002.

HURT, M; NIEDERKORN, J; ALIZADEH, H. Effects of mannose on *Acanthamoeba castellanii* proliferation and cytolytic ability to corneal epithelial cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.44, p.3424-3431, 2003a.

HURT, M; NEELAM, S.; NIEDERKORN, J; ALIZADEH, H. 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.

JONES, B.R.; VISVESVARA, G.S.; ROBINSON, N.M. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. **Trans. Ophthalmol. Soc.** v.95, p.221-232, 1975.

JOSLIN, C.E.; TU, E.Y.; MCMAHON, T.T.; PASSARO, D.J.; STAYNER, L.T.; SUGAR, J. Epidemiological characteristics of a Chicago-area *Acanthamoeba* keratitis. **Am J Ophthalmol.** v.142, p.212-217, 2006.

KANSKI, J. J. Oftalmologia clínica: Uma abordagem sistemática. 2004. Tradução da 5º edição. Editora Elsevier. 719 páginas.

KHAN, N.A.; JARROLL, E.L.; PANJWANI, N.; CAO, Z.; PAGET, T.A. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. **J. Clin. Microbiol.** v.38, p.2858-2861, 2000.

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

KHAN, N.A.; JARROLL, E.L.; PAGET, T.A. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. **Curr Microbiol.** v.45 n.3 p.197-202, 2002.

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

KHAN, N.A.; TAREEN, N.K. 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 Microbiol Rev.** v.30, p.564-595, 2006.

KHAN N.A. *Acanthamoeba* - Biology and Pathogenesis. **Caister Academic Press:** Norfolk, Great Britain, 290 páginas, 2009.

KIM, H.K.; HA, Y.R.; YU, H.S.; KONG, H.H. & CHUNG, D.I. Purification and characterization of a 33 kDa serine protease from *Acanthamoeba lugdunensis* KA/E2 isolated from a Korean keratitis patient. The Korean **Journal of Parasitology.** v.41 n.4, p.189-196, 2003.

KIM, W.T.; KONG, H.H.; HA, Y.R.; HONG, Y.C.; JEONG, H.J.; YU, H.S.; CHUNG, D.I. Comparison of specific activity and cytopathic effects of purified 33 kDa serine proteinase from *Acanthamoeba* strains with different degree of virulence. **Korean J. Parasitol.** v.44 n.4, p.321-330, 2006.

KLEMBA, M.; GOLDBERG, D.E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. **Annu Rev Biochem.** v.71, p.275-305, 2002.

KOESHLER, M.; LEITSCH, D.; DUCHENE, M.; NAGL, M.; WALOCHNIK, J. *Acanthamoeba castellanii*: 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 Microbiol Lett.** v.299 n.2, p.121-127, 2009.

KONG H.H.; KIM, T.H.; DI, C. Purification and characterization of a secretory serine proteinase of *Acanthamoeba healyi* isolated from GAE. **J. Parasitol.** v.86, p.12-17, 2000.

LANDELL, M.F.; SALTON, J.; CAUMO, K.; BROETTO, L.; ROTT, M.B. Isolation and genotyping of free-living environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. from bromeliads in Southern Brazil. **Experimental Parasitology** v.134 p. 290–294, 2013.

LAKOMY, D.; SOULIÉ, M.; BADOR, J.; VALOT, S.; L'OLLIVIER, C.; DALLE, F.; BRON, A.; CREUZOT-GARCHER, C.; VAGNER, O.; BONNIN, A. Une kératite à amibes libres chez un non porteur de lentilles de contact. **Annales de Biologie Clinique.** v.63 n.5, p.531-534, 2005.

LEE, J.Y.; SONG, S.M.; MOON, E.K.; LEE, Y.R.; JHA, B.K.; DANNE, D.B.S.; CHA, H.J.; YU, H.S.; KONG, H.H.; CHUNG, D-II, HONG, Y. Cysteine Protease Inhibitor (AcStefin) Is Required for Complete Cyst Formation of *Acanthamoeba*. **Eukaryotic Cell.** v.12 n.4, p.567-574, 2013.

LEE, Y.R.; NA, B.K.; MOON, E.K.; SONG, S.M.; JOO, S.Y.; KONG, H.H.; GOO, Y.K.; CHUNG, D.I.; HONG, Y. Essential Role for an M17 Leucine Aminopeptidase in Encystation of *Acanthamoeba castellanii*. **PLoS ONE** v.10 n.6 p.1-18, 2015.

LEHER, H.; SILVANY, R.; ALIZADEH, H.; HUANG, J.; NIEDERKORN, J.Y. Mannose Induces the Release of Cytopathic Factors from *Acanthamoeba castellanii*. **Infection and Immunity.** V.66 n.1 p. 5-10, 1998.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principios de Bioquímica.** Ed. Sarvier, 1995.

LEITSCH, D.; KOHSLER, M.; MARCHETTI-DESCHMANN, M.; DEUTSCH, A.; ALLMAIER, G.; DUCHÊNE, M.; WALOCHNIK, J. Major Role for Cysteine Proteases during the Early Phase of *Acanthamoeba castellanii* Encystment. **Eukaryot Cell.** v. 9 n.4, p.611–618, 2010.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.;

MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKI, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised Classification of the Protozoa. **J. Protozool.** v.27 n.1, p.37-58, 1980.

LORENZO-MORALES, J.; LINDO, J.F.; MARTINEZ, E.; CALDER, D.; FIGUERUELO, E.; VALLADARES, B.; ORTEGA-RIVAS, A. Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. **Ann Trop Med Parasitol.** v. 99 n.8 p. 751-8, 2005.

LORENZO-MORALES J.; MARTÍN-NAVARRO C.M.; LÓPEZ-ARENCIBIA A.; ARNALICH-MONTIEL F.; PIÑERO J.E.; VALLADARES B. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? **Trends in Parasitology.** v.29 n.4, p.181-187, 2013.

LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N.A.; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite** v.22 n.10, p.1-20, 2015.

MACIVER, S.K.; ASIF, M.; SIMMEN, M.W.; LORENZO-MORALES, J. A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. **Eur. J. Protist.** v.49 n.2, p.217-221, 2013.

MAGLIANO, A.C.M. **Diversidade de *Acanthamoeba* spp no Brasil: isolamento, genotipagem, aspectos fisiológicos e relações filogenéticas entre isolados de ambiente e de casos clínicos.** 2011. Tese (Doutorado em Parasitologia) -Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MAGHSOOD, A.H.; SISSONS, J.; REZAIAN, M.; NOLDER, D.; WARHURST, D.; KHAN, N.A. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology.** v.54, p.755-759, 2005.

MAGNET, A.; GALVAN, A.L.; FENOY, S.; IZQUIERDO, F.; RUEDA, C.; VADILLO, C.F.; PEREZ-IREZABAL, J.; BANDYOPADHYAY, K.; VISVESVARA, G.S.; DA SILVA A.J.; DEL AGUILA, C. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in

water treatment plants and comparison with clinical isolates. **Parasitol. Res.** v.111, p.383-392, 2012.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in Humans. **Clin. Microbiol. Rev.** v.16 n.2, p.273-307, 2003.

MARTINEZ, J.M.; SOTELO-AVILA, C.; ALCALÁ, H.; WILLAERT, E. Granulomatous encephalitis, intracranial arteritis and mycotic aneurysm due to a free-living amoeba. **Acta Neuropathol.** v.49, p.7-12, 1980.

MARTINEZ, A.J.; VISVESVARA, G.S. Free-living, amphizoic and opportunistic amoebas. **Brain Pathol.** v.7, p.583-598, 1997.

MASCHIO, V.J.; CHIES, F.; CARLESSO, A.M.; CARVALHO, A.; ROSA, S.P.; VAN DER SAND, S.T.; ROTT, M.B. *Acanthamoeba* T4, T5 and T11 isolated from mineral water bottles in southern Brazil. **Curr Microbiol.** v. 70 n.1 p.6-9, 2015.

MIEDZIAK, A.I.; MILLER, M.R.; RAPUANO, C.J.; LAIBSON, P.R.; COHEN, E.J. Risk factors in microbial keratitis leading to penetrating keratoplasty. **Ophthalmology** v.106 n.6 p.1166-70, 1999.

MITRA, M.M.; ALIZADEH H.; GERARD RD & NIEDERKORN JY Characterization of a plasminogen activator produced by *Acanthamoeba castellanii*. **Mol Biochem Parasitol** v.73: 157-164, 1995.

MITRO, K.; BHAGAVATHIAMMAI, A.; ZHOU, O.M.; BOBBETT, G.; MCKERROW, J.H.; CHOKSHI, R.; CHOKSHI, B.; JAMES, E.R. Partial characterization of the proteolytic secretions of *Acanthamoeba polyphaga*. **Experimental Parasitology.** v.78, p.377-385, 1994.

MOON E.K.; XUAN, Y.H.; CHUNG D.I.; HONG, Y.; KONG, H.H. Microarray Analysis of Differentially Expressed Genes between Cysts and Trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. **The Korean Journal of Parasitology.** v.49, n.43, p.341-347, 2011.

MORIYAMA, A.; HÖFLING-LIMA, A.L. Contact lens-associated microbial keratitis. **Arq. Bras. Oftalmol.** v.71 n.6, 32-36, 2008.

NA, B.K.; KIM, J.C.; SONG, C.Y. Characterization and pathogenetic role of proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. **Microb Pathog.** v.30, p.39-48, 2001.

NAGINGTON, J.; WATSON, P.G.; PLAYFAIR, T.J.; MCGILL, J.; JONES, B.R. STEELE, A.D. Amoebic infection of the eye. **Lancet.** p.1537-1540, 1974.

NIYYATI, M.; RAHIMI, F.; LASEJERDI, Z.; REZAEIAN, M. Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae in Contact Lenses of the Asymptomatic Contact Lens Wearers. **Iranian Journal of Parasitology.** v.9(1), p.14-19, 2014.

NIYYATI, M.; REZAEIAN, M. Current Status of *Acanthamoeba* in Iran: A Narrative Review Article. **Iran J Parasitol.** v.10 n.2 p.157-63, 2015.

NOSÉ, W.; SATO, E.H.; FREITAS, D. et al. Úlcera de córnea por *Acanthamoeba*: quatro primeiros casos no Brasil. **Arq Bras Oftalmol.** v.51, p.223-226, 1988.

NUPRASERT, W.; PUTAPORNTIP, C.; PARIYAKANOK, L.; JONGWUTIWES, S. Identification of a novel t17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and t10 genotype causing keratitis in Thailand. **J. Clin. Microbiol.** v.48, p4636-4640, 2010.

OBEID, W.N.; ARAÚJO, R.; VIEIRA, L.A.; MACHADO, M.A.C. Ceratite bilateral por *Acanthamoeba*: relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia,** v.66 n.6, p.876-880, 2003.

OMAÑA-MOLINA, M.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; SALAZAR-VILLATORO, L.I.; LORENZO-MORALES, J.; CRISTÓBAL-RAMOS, A. R.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, V.I.; TALAMÁS-ROHANA, P.; CRUZ, A.R. M.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. Reevaluating the role of *Acanthamoeba* proteases in tissue invasion: observation of cytopathogenic mechanisms on MDCK cell monolayers and hamster corneal cells. **BioMed Research International,** 2013, 13 páginas.

PACHECO, L.G.; MARTINS, A.V. A Importância dos Estudo das Amebas de Vida Livre. **Saúde & Ambiente em revista.** v.3 .1, p. 57-65, 2008.

PADZIK, M.; CHOMICZ, G.; SZAFLIK, J.P.; CHRUSCIKOWSKA, U.M.; PERKOWSKI, K.; SZAFLIK, J. In vitro effects of selected contact lens care solutions on *Acanthamoeba castellanii* strains in Poland. **Experimental Parasitology** v.145, S98-S101, 2014.

PAGE, F. C. A further study of taxonomic criteria for *Limax* amoebae, with descriptions of new species and a key to genera. **Arch. Protistenkd** v.116 p.S149, 1974.

PARMAR, D.N.; AWWAD, S.T.; PETROLL, W.M.; BOWMAN, R.W.; MCCULLY, J.P.; CAVANAGH, D. Tandem scanning confocal corneal microscopy in the diagnosis of suspected *Acanthamoeba* keratitis. **Ophthalmology.** v.113, p.538-547, 2006.

PARQUE, M.K.; CHO, M.K.; KANG, S.A.; PARQUE, H.K.; KIM, D.H.; YU, H.S. *Acanthamoeba* Protease Activity Promotes Allergic Airway Inflammation via Protease-Activated Receptor 2. **PLoS ONE.** v.9 n.3, e92726, 2014.

POSSAMAI, C.O. **Classificação morfológica, genotipagem e avaliação da patogenicidade de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* em Vitória e região metropolitana (ES).** 2012. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) Programa de pós-graduação em doenças infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.

PUMIDONMING, W.; KOEHLER, M.; LEITSCH, D.; WALOCHNIK, J. Protein profiles and immunoreactivities of *Acanthamoeba* morphological groups and genotypes. **Experimental Parasitology.** v.45, p.550-556, 2014.

PUSHKAREW, B.M. Uber die Verbreitung der Susswasser-Protozoen durch die Luft. **Arch. Protistent.** v.23, p.323-362, 1913.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica.** v.8, p.557-598, 1977.

QVARNSTROM, Y.; VISVESVARA, G.S.; SRIRAM R.; SILVA, A.J. Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. **J. Clin. Microbiol.** v.44 n.10, 3589-3595, 2006.

QVARNSTROM, Y.; SILVA, A.J.; SCHUSTER, F.L.; GELMAN, B.B.; VISVESVARA, G.S. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. **J. Infect. Dis.** v.199 n.8, p.1139-1142, 2009.

QVARNSTROM, Y.; NERAD, T.A.; VISVESVARA, G.S. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. **J. Eukaryot. Microbiol.** v.60 n.6 p.626–633, 2013.

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

RINGSTED, J.; JAGER, B.V.; SUK, D.; VISVESVARA, G.S. Probable *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a Korean child. **Am. J. Clin. Pathol.** v.66, p.723-730, 1976.

RISLER, A.; COUPAT-GOUTALAND, B.; PÉLANDAKIS, M. Genotyping and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* isolates associated with keratitis. **Parasitol Res.** v.112 n.11 p.3807-16, 2013.

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

ROCHA-AZEVEDO, B.; TANOWITZ, H.B.; MARCIANO-CABRAL, F. Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases** v.2009, ID 251406, 14 páginas.

ROCHA-CABRERA, P.; REYES-BATLLE, M.; MARTÍN-NAVARRO, C.M.; DORTA-GORRÍN, A.; LÓPEZ-ARENCIBIA, A.; SIFAQUI, I.; MARTÍNEZ-CARRETERO, E.; PIÑERO, J.E.; MARTÍN-BARRERA, F.; VALLADARES, B.; LORENZO-MORALES, J. Detection of *Acanthamoeba* on the ocular surface in a Spanish population using the

Schirmer strip test: pathogenic potential, molecular classification and evaluation of the sensitivity to chlorhexidine and voriconazole of the isolated *Acanthamoeba* strains. **J. Med. Microbiol.** v.64, p.849-853, 2015.

SACRAMENTO, R.S.; CASTRO, L.; FREITAS, D.; BRANCO, B.C.; LIMA, A.L.H.; VIEIRA, L.; et al. Estudo dos fatores epidemiológicos e influentes na ceratite microbiana em serviço universitário. **Rev Bras Oftalmol.** v.64 n.1 p.7-13, 2005.

SAHEB, E.; TRZYNA, W.; BUSH, J. An *Acanthamoeba castellanii* metacaspase associates with the contractile vacuole and functions in osmoregulation. **Exp Parasitol.** v.133 n.3, p.314-326, 2013.

SAHEB, E.; TRZYNA, W.; BUSH, J. Caspase-like proteins: *Acanthamoeba castellanii* metacaspase and *Dictyostelium discoideum* paracaspase, what are their functions? **J. Biosci.** v.39 n.5, p.909-916, 2014.

SALLES-GOMES, C.E.J.; BARBOSA, E.R.; NOBREGA, J.P.S.; SCAFF, M.; SPINA-FRANÇA, A. Meningoencefalomielite amebiana primária. Registro de caso. **Arq. Neuro-psiquiatria.** v.36 n.2, p.139-142, 1978.

SCHROEDER, J.M.; BOOTON, G.C.; HAY, J.; NISZL, I.A.; SEAL, D.V.; MARKUS, M.B.; FUERST, P.A.; BYERS, T.J. Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. **J. Clin. Microbiol.** v.39, p.1903-1911, 2001.

SCHUSTER, F.L. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. **Clinical Microbiology Reviews.** v.15 n.3 p.342–354, 2002.

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

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

SERRANO-LUNA, J.J.; CERVANTES-SANDOVAL, I.; CALDERÓN, J.; NAVARRO-GARCÍA, F.; TSUTSUMI, V.; SHIBAYAMA, M. Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. **Can. J. Microbiol.** v.52, p.16-23, 2006.

SERRANO-LUNA, J.; PIÑA-VÁZQUEZ, C.; REYES-LÓPEZ, M.; ORTIZ-ESTRADA, G.; DE LA GARZA, M. Proteases from *Entamoeba* spp. and Pathogenic Free-Living Amoebae as Virulence Factors. **Journal of Tropical Medicine** v. 2013, ID 890603, 32 páginas.

SHARMA, S.; SRINIVASAN, M.; GEORGE, C. *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers. **Arch Ophthalmol.** v.108 n.5 p.676-678, 1990.

SHARMA, S.; GARG, P.; RAO, G.N. Patient characteristics, diagnosis and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. **Br J Ophthalmol** v.84 p.1103–1108, 2000.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N.A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasit Vectors** v.5 n.6, 2012.

SILVA, M.A.; ROSA, J.A. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. **Rev. Saúde Pública**, v.37 n.2, p.242-246, 2003.

SISSONS J.; KIM K.S.; STINS M.; JAYASEKERA S.; ALSAM S.; KHAN N.A. *Acanthamoeba castellanii* induces host cell death via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. **Infect Immun.** v.73, p.2704-2708, 2005.

SOUSA, S.J.F.; DIAS, V.G.; MARCOMINI, L.A.G. Bilateral *Acanthamoeba* ulcer in a user of disposable soft contact lenses: a tragic incident or a consequence of the aggressive policy of soft contact lens trading? **Arq. Bras. Oftalmol.** v.71(3), p.430-433, 2008.

SOUZA-CARVALHO, F.R.; CARRIJO-CARVALHO, L.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; FORONDA, A.S.; DE FREITAS, D. Serine-like proteolytic enzymes correlated with differential pathogenicity in patients with acute *Acanthamoeba* keratitis. **Clin. Microbiol. Infect.** v.17, p.603-609, 2011.

STAPLETON, F.; OZKAN, J.; JALBERT, I.; HOLDEN, B.A.; PETSOGLU, C.; MCCLELLAN, K. Contact Lens-Related *Acanthamoeba* Keratitis. **Optom. Vis. Sci.** v.86, E1196-201, 2009.

STOTHARD, D.R.; SCHROEDER-DIEDRICH, J.M.; AWWAD, M.H.; GAST, R.J.; LEDEE, D.R.; RODRIQUEZ-ZARAGOZA, S.; DEAN, C.L.; FUERST, P.A.; BYERS, T.J. The evolutionary history of genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **J. Eukaryot. Microbiol.** v.45, p.45-54, 1998.

SYAM, P.P.; NARENDRAN, R.; HOEK, J.V.D. Persistent *Acanthamoeba* keratitis in a non-contact lens wearer following exposure to bird seed dust. *Br J Ophthalmol.* v.89 n.3 p.388–389, 2005.

TRABELSI, H.; DENDANA, F.; SELLAMI, U.M.; SELLAMI, H.; CHEIKHROUHOU, F.; NEJI, S.; MAKNI, F.; AYADI, UMA. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. **Pathol. Biol.** (Paris). v.60 n.6, p.399-405, 2012.

VAN KLINK, F.; ALIZADEH, H.; HE, Y.; MELLON, J.A.; SILVANY, R.E.; MCCULLEY, J.P.; NIEDERKORN, J.Y. The role of contact lenses, trauma, and Langerhans cells in a Chinese hamster model of *Acanthamoeba* keratitis. *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.* v.34, p.1937-1944, 1993.

VERÍSSIMO, C.M. **Caracterização da atividade proteolítica de isolados ambientais e cepas padrão de *Acanthamoeba* spp e sua relação com a patogenicidade in vivo.** 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

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

VILLANI, E.; BAUDOUIN, C.; EFRON, N.; HAMRAH, P.; KOJIMA, T.; PATEL, S.V.; PFLUGFELDER, S.C.; ZHIVOV, A.; DOGRU, M. In vivo confocal microscopy of the ocular surface: from bench to bedside. **Current Eye Research,** v.39 n.3, p.213–231, 2014.

VISVESVARA G.S.; MIRRA S.S.; BRANDT F.H.; MOSS D.M.; MATHEWS H.M.; MARTIN A.J. Isolation of Two Strains of *Acanthamoeba castellanii* from Human Tissue and Their Pathogenicity and Isoenzyme Profiles. **J. Clin. Microbiol.** v.18, p.1405-1412, 1983.

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

VISVESVARA, G.S.; SHOFF, M.E.; SRIRAM, R.; BOOTON, G.C.; CRARY, M.; FUERST, P.A.; HANLEY, C.S.; GARNER, M.M. Isolation, morphologic, serologic and molecular identification of *Acanthamoeba* T4 genotype from the liver of a Temminck's tragopan (*Tragopan temminckii*). **Vet. Parasitol.** v.170, p.197-200, 2010.

VISVESVARA, G.S. Infections with free-living amoebae. **Handb. Clin. Neurol.** v.114, p.153-168, 2013.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Correlations between Morphological, Molecular Biological, and Physiological Characteristics in Clinical and Nonclinical Isolates of *Acanthamoeba* spp. **Applied Environ. Microbiol.** v.66, p.4408-4413, 2000.

WALOCHNIK, J.; AICHELBURG, A.; ASSADIAN, O.; STEUER, A.; VISVESVARA, G.; VETTER, N.; ASPÖCK, H. Granulomatous Amoebic Encephalitis Caused by *Acanthamoeba* Amoebae of Genotype T2 in a Human Immunodeficiency Virus-Negative Patient. **J Clin Microbiol.** v.46 n.1, p.338-340, 2008.

WALOCHNIK, J.; SCHEIKL, U.; HALLER-SCHÖBER, E.M. Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. **J Eukaryot Microbiol.** v.62 n.1 p.3-11, 2015.

WINCHESTER, K.; MATHERS, W.D.; SUTPHIN, J.E.; DALEY, T.E. Diagnosis of *Acanthamoeba keratitis* in vivo with confocal microscopy. **Cornea** v.14, p.10-17, 1995.

YANG, Y.; WEN, Y.J.; CAI, Y.N.; VALLÉE, I.; BOIREAU, P.; LIU, M.Y.; CHENG, S.P. Serine Proteases of Parasitic Helminths. The Korean **Journal of Parasitology** v.53 n.1, p.1-11, 2015.

YOUSUF, F.A.; SIDDIQUI, R.; KHAN, N.A. *Acanthamoeba castellanii* of the T4 genotype is a potencial environmental host for *Enterobacter aerogenes* and *Aeromonas hydrophila*. **Parasites & Vectors**. v.6 n.169, p.1-8, 2013.

YUEHUA, W.; XIANMIM, F.; LINZHE, J. Current advances in diagnostic methods of *Acanthamoeba keratitis*. Chinese Medical Journal v.127, n.17, p.3165-3170, 2014.

ZANELLA, J.F.P. ***Acanthamoeba* spp em ambientes hospitalares acadêmicos no Rio Grande do Sul, Brasil. 2011.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.

ZANELLA, J.; COSTA, S.O.P.; ZACARIA, J.; ECHEVERRIGARAY, S.A.. Rapid and Reliable Method for the Clonal Isolation of *Acanthamoeba* from Environmental Samples. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.55, p.1-6, 2012.

ZAMORA, A.; HENDERSON, H.; SWIATLO, E. *Acanthamoeba* encephalitis: A Case Report and Review of Therapy. **Surgical Neurology International**. v.5 p.68, 2014.

## ANEXO I - Protocolo meio PYG (ALFIERI et. al., 2000)

	100mL	500mL	1000mL
1 – Sulfato de Magnésio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,098g	0,49g	0,98g
2 – Cloreto de Cálcio ( $CaCl_2$ )	0,006g	0,03g	0,06g
$CaCl_2$ dihidratado	0,008g	0,04g	0,08g
3 – Glicose	0,900g	4,50g	9,00g

- Solubilizar os reagentes 1, 2 e 3 em frasco separado, em pequeno volume, a ser adicionado à solução final.

4 – Sulfato de Ferro Amônico ( $Fe(NH_4)_2(SO_4) \cdot 6H_2O$ )	0,002g	0,01g	0,02g
5 – Fosfato dibásico de Sódio ( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,040g	0,20g	0,40g
$Na_2HPO_4$ dodecahidratado	0,053g	0,265g	0,53g
6 – Fosfato monobásico de potássio ( $KH_2PO_4$ )	0,034g	0,17g	0,34g
7 – Citrato de Sódio ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ )	0,100g	0,50g	1,00g
8 – Proteose Peptona	2,00g	10,0g	20,0g
9 – Extrato de Levedura	0,200g	1,00g	2,00g

- Adicionar extrato de levedura e a peptona por último.
- Acertar o pH para 6,5.
- Aliquotar em volumes de 100 a 250 mL
- Esterilizar em autoclave 20 minutos

➤ **Uso de soro bovino fetal esterilizado a 10% é opcional. Neste caso acrescentar ao meio, depois de esterilizado e frio:**

	100mL	500mL	1000 mL
Soro bovino fetal esterilizado	10 mL	50 mL	100mL
Penicilina sol. 500.000 U/mL	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L
Alternativamente, Enrofloxacin 50 mg/mL	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L	50 $\mu$ L

- Distribuir em tubos de cultivo ou garrafas (alta tensão de  $O_2$ , baixo volume de meio no frasco)
- Incubar os frascos a 36° C para efetuar prova de esterilidade. Guardar os demais em geladeira (até 2 semanas)

**ANEXO II – Média dos valores de atividade das proteases secretadas (U/mL) por trofozoítos de *Acanthamoeba*, avaliado por ensaio de azocaseína, antes e após interação por 72 horas com células MDCK, incubadas ou não com inibidores PMSF (concentração final 1 mM) e EDTA (concentração final 10 mM).**

Condições		Cepas <sup>a</sup>					
		ALX	AP4	AR14	AR15	LG	R2P5
Pré interação	Sem inibidor	0,604 ± 0,332 <sup>c, d</sup>	0,337 ± 0,260	0,700 ± 0,410 <sup>e</sup>	0,959 ± 0,344 <sup>b, d</sup>	0,396 ± 0,395	3,003 ± 1,600 <sup>c, e</sup>
	PMSF	0,067 ± 0,080 <sup>d</sup>	0,100 ± 0,022	0,059 ± 0,056 <sup>e</sup>	0,052 ± 0,056 <sup>d</sup>	0,074 ± 0,061	0,226 ± 0,084 <sup>c, e</sup>
	EDTA	0,426 ± 0,260	0,381 ± 0,137	0,448 ± 0,221	0,978 ± 0,102	0,115 ± 0,101	2,345 ± 0,667
Pós interação	Sem inibidor	0,118 ± 0,109 <sup>c</sup>	0,141 ± 0,089	0,148 ± 0,127	0,119 ± 0,099 <sup>b</sup>	0,156 ± 0,106	0,319 ± 0,136 <sup>c</sup>
	PMSF	0,130 ± 0,084	0,200 ± 0,106	0,111 ± 0,091	0,122 ± 0,084	0,130 ± 0,119	0,115 ± 0,059
	EDTA	0,133 ± 0,113	0,130 ± 0,090	0,148 ± 0,116	0,126 ± 0,059	0,152 ± 0,139	0,282 ± 0,190

<sup>a</sup> Medida ± Desvio Padrão (U/mL)

<sup>b</sup> Valores com diferença significativa (P<0,05) para análise da condição “sem inibidor”, nos grupos antes e após a interação com células MDCK.

<sup>c</sup> Valores com tendência (P<0,10) para análise da condição “sem inibidor”, nos grupos antes e após a interação com células MDCK.

<sup>d</sup> Valores com diferença significativa (P<0,05) para análise do grupo pré interação com células MDCK, nas condições “sem inibidor” e “PMSF”.

<sup>e</sup> Valores com tendência (P<0,10) para análise do grupo pré interação com células MDCK, nas condições “sem inibidor” e “PMSF”.