

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

CECÍLIA CIRELLI DOS SANTOS FERREIRA

ANÁLISE METABOLÔMICA DO PROCESSO DE ENCISTAMENTO DE
Acanthamoeba castellanii

Belo Horizonte

2018

CECÍLIA CIRELLI DOS SANTOS FERREIRA

ANÁLISE METABOLÔMICA DO PROCESSO DE ENCISTAMENTO DE
Acanthamoeba castellanii

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

Orientador(a): Profa. Dra. Adriana Oliveira Costa

Belo Horizonte

2018

F383a Ferreira, Cecília Cirelli dos Santos.
Análise metabólica do processo de encistamento de
Acanthamoeba castellanii / Cecília Cirelli dos Santos Ferreira. – 2018.
85 f. : il.

Orientadora: Adriana Oliveira Costa.

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

1. *Acanthamoeba castellanii* – Teses. 2. Metabólica – Teses. 3.
Doenças parasitárias – Teses. 4. Ameba – Teses. 5. I. Costa, Adriana
Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de
Farmácia. III. Título.

CDD:616.96

Elaborado por Aline Guimarães Amorim – CRB-6/2292




FOLHA DE APROVAÇÃO

Análise metabólica do processo de encistamento de Acanthamoeba castellanii

CECÍLIA CIRELLI DOS SANTOS FERREIRA

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 09 de agosto de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Adriana Oliveira Costa - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof. Jonatas Santos Abrahao
UFMG


Prof. Marina Gonçalves Diniz
UFMG

Belo Horizonte, 9 de agosto de 2018.

Trabalho realizado no Laboratório de Parasitologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a orientação da Profa. Dra. Adriana Oliveira Costa. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) com bolsa de mestrado concedida pela Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES, 2016/2017).

*Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.
(Álvaro de Campos)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Lúcia e Sebastião, pelo apoio incondicional a todas as minhas escolhas, torcendo e apoiando sempre minha felicidade.

À minha irmã Giselle, por sempre ter sido um grande exemplo pessoal e profissional, pela torcida e pelas palavras de apoio nos momentos difíceis.

Ao Arthur, por ter me dado a mão nos momentos mais difíceis e por ter tornado esse caminho tão mais leve.

À minha família, por compartilharem da alegria pelas minhas conquistas.

À minha orientadora Adriana, pela confiança em mim depositada nesse e em outros projetos, pelo incentivo aos meus objetivos além do mestrado e pela amizade.

Ao Dr. Juliano Simões de Toledo, pela colaboração nesse projeto e por toda a ajuda durante o curto tempo que tivemos para desenvolvê-lo.

Ao Filipe, a quem devo um agradecimento especial, por ter sido uma luz na elaboração e execução de um novo projeto, me ajudando em todas as etapas. Sem você esse trabalho não seria possível. Obrigada, ainda, pela amizade!

À Jéssica e à Isabela, agradeço pela ajuda na execução da parte experimental e teórica desse trabalho todas as vezes que precisei e pela ajuda como um todo nesses anos de laboratório. Agradeço a elas e também à Carol pela amizade e momentos bons juntas.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Jônatas dos Santos Abrahão, Dra. Marina Gonçalves Diniz e ao Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino por aceitarem o nosso convite para participar da banca.

À Profa. Dra. Gisele Canuto, que muito gentilmente aceitou a colaboração nas análises metabolômicas desse projeto.

À Prof. Dra. Ana Paula Salles, pela colaboração e ajuda no decorrer deste e outros projetos.

À Profa. Dra. Leiliane Coelho André e todos do Laboratório de Toxicologia, pela ajuda e disponibilidade na execução dos experimentos executados.

Ao Prof. Dr. Daniel de Assis Santos e seus alunos, pela ajuda com diversos experimentos e contribuição para o meu amadurecimento.

Aos técnicos Vanda, Beto, Leninha, Mariza e as funcionárias da limpeza ajuda e manutenção do laboratório.

Ao corpo docente e discente do Programa de Pós-Graduação pela estrutura e apoios sempre oferecidos.

Aos Laboratórios de Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia pelo suporte.

À agência de fomento CAPES pela concessão da minha bolsa de estudos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Atual classificação filogenética de <i>Acanthamoeba</i> em relação as outras amebas de vida livre.....	17
Figura 2. Formas evolutivas de <i>Acanthamoeba</i> spp.	18
Figura 3. Formas evolutivas de <i>Acanthamoeba</i> spp, vias de entrada no corpo humano e as doenças associadas	22
Figura 4. Aparência clínica da ceratite por <i>Acanthamoeba</i>	25
Figura 5. Lesões cutâneas causadas por <i>Acanthamoeba</i>	28
Figura 6. Corte coronal do cérebro mostrando extensa necrose cortical e subcortical em um caso fatal de Encefalite Amebiana Granulomatosa..	29
Figura 7. Microscopia eletrônica das formas de <i>Acanthamoeba</i>	31
Figura 8. Correlação entre as ferramentas ômicas utilizadas nos estudos biológicos	33
Figura 9. Cinética de encistamento de <i>Acanthamoeba castellanii</i> em salina de Neff.	43
Figura 10. Análise de componentes principais construído com os <i>features</i> totais obtidos pelo GC-MS na presença dos QCs, em amostras de <i>Acanthamoeba castellanii</i> em processo de encistamento em salina de Neff.....	44
Figura 11. Classificação bioquímica dos compostos identificados por GC-MS em amostras de <i>Acanthamoeba castellanii</i> em processo de encistamento em salina de Neff.....	45
Figura 12. PLS-DA diferencia os estágios de cisto e trofozoítos.....	47
Figura 13. Avaliação do perfil metabólico das diferentes formas evolutivas de <i>Acanthamoeba castellanii</i> por <i>Heatmap</i>	49
Figura 14. PLS-DA diferencia o perfil metabólico nos tempos de cultivo avaliados.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação morfológica dos cistos de <i>Acanthamoeba</i>	21
Tabela 2. Metabólitos que diferem significativamente os estágios de trofozoíto e cisto.....	53
Tabela 3. Vias metabólicas de <i>Acanthamoeba castellanii</i> em processo de encistamento enriquecidas utilizando o programa MBRole 2.0.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL	Micro litro
μm	Micrômetro
°C	Graus Celsius
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
AVL	Amebas de vida livre
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada
CA	Ceratite por <i>Acanthamoeba</i>
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CE	Eletroforese capilar
cm	Centímetros
CSP21	Proteína específica de cisto 21
EAG	Encefalite amebiana granulomatosa
eV	Elétron-volt
GC	Cromatografia gasosa
HCA	Análise de agrupamentos hierárquicos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
kDa	Quilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LC	Cromatografia líquida
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mOsm	Miliosmol
mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrometria de massas

NMR	Ressonância magnética nuclear
PBS	Tampão fosfato-salino
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PLS-DA	Análise discriminante por método de mínimos quadrados parciais
pmol	Picomol
ppm	Partes por milhão
PYG	Protease-Peptona-Extrato de levedura
QC	Controle de qualidade
rDNA	DNA ribossômico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SNC	Sistema nervoso central
TLG	Transferência lateral genética
VIP	Importância variável da projeção

RESUMO

As amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* são protozoários ubíquos que eventualmente agem como parasitas, causando infecções graves como a encefalite amebiana granulomatosa e a ceratite amebiana. Um dos aspectos importantes da fisiopatologia das acantamebíases é a capacidade de encistamento do protozoário nos tecidos infectados. Os cistos de *Acanthamoeba* são formados por paredes duplas resistentes, resultando em menor eficácia de medicamentos e consequente demora no tratamento das infecções e ainda em falha terapêutica. O processo de encistamento ainda não é amplamente compreendido e as ciências ômicas podem fornecer importantes contribuições na avaliação do fenótipo de organismo. Portanto, esse trabalho teve como objetivo determinar o perfil metabólico de *Acanthamoeba castellanii* durante o processo de diferenciação celular de trofozoítos para cistos. Uma cepa de *A. castellanii* em cultivo axênico foi induzida ao encistamento em salina de Neff, estabelecendo-se a cinética de formação de pré-cistos e cistos. Culturas em tempo zero (somente trofozoítos), 24 horas (encistamento iniciado) e 72 horas (somente cistos) foram submetidas à extração de metabólitos para avaliação por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS). Foram identificados dezoito metabólitos com significância estatística, incluindo aminoácidos, lipídios, carboidratos, compostos nitrogenados e poliaminas. De forma geral, houve redução da concentração dos metabólitos com o avanço do encistamento, com exceção da arbutina, celobiose e lactose. Os resultados indicam uma diminuição do metabolismo de *Acanthamoeba* durante o encistamento, além de alteração de sua fonte energética e de carbono. Sugere-se ainda o envolvimento dos transportadores ABC no encistamento, como possíveis exportadores do produto da degradação de organelas e macromoléculas no processo.

PALAVRAS-CHAVE: *Acanthamoeba castellanii*. Encistamento. Metabolômica.

ABSTRACT

The free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba* are ubiquitous protozoa that can eventually act as parasites, causing serious infections such as granulomatous amoebic encephalitis and amoebic keratitis. A relevant aspect of the pathophysiology of acanthamoebiasis is the ability of the protozoa to encyst on infected tissues. *Acanthamoeba* cysts present resistant double walls, resulting in lower efficacy of drugs, delay in the treatment and therapeutic failure. The encystment process is not entirely understood and the “omics” sciences can contribute to evaluate the phenotype of organisms. Thus, the aim of this work was to determine the metabolic profile of *Acanthamoeba castellanii* during the process of cell differentiation of trophozoites into cysts, since the “omics” sciences can contribute to the evaluation of gene expression and phenotype of organisms. Encystment was induced in a strain of *A. castellanii* in axenic culture with Neff saline, establishing the kinetics of pre-cysts and cysts formation. Time zero (trophozoites only), twenty-four hours (transformation initiated) and seventy-two hours (cysts only) cultures were submitted to extraction of metabolites for evaluation by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). Eighteen metabolites with statistical significance were identified, including amino acids, lipids, carbohydrates, nitrogen compounds and polyamines. In general, there was a reduction of the concentration of metabolites with the advance of the encystment, with the exception of arbutine, cellobiose and lactose. The results indicated a decrease of *Acanthamoeba* metabolism during encystment, as well as an alteration of its energy and carbon source. The involvement of ABC transporters in encystment was also suggested. They could act as exporters of degradation products from organelles and macromolecules during the process.

KEYWORDS: *Acanthamoeba castellanii*. Encystment. Metabolomics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Histórico do gênero <i>Acanthamoeba</i> e classificação taxonômica.....	16
2.2 Morfologia e biologia de <i>Acanthamoeba</i>	17
2.3 Distribuição ambiental de <i>Acanthamoeba</i>	19
2.4 Classificação morfológica e molecular do gênero <i>Acanthamoeba</i>	20
2.5 Infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i>	21
2.5.1 Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> (CA).....	21
2.5.2 Encefalite Amebiana Granulomatosa	26
2.6 Processo de encistamento de <i>Acanthamoeba</i>	30
2.7 As ferramentas ômicas no estudo da diversidade molecular de <i>Acanthamoeba</i>	32
2.7.1 Metabolômica.....	34
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivos gerais.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Amostras de protozoários.....	38
4.2 Cinética de encistamento.....	38
4.3 Análise metabolômica de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	39
4.3.1 <i>Quenching</i> metabólico	39
4.3.2 Extração e derivatização dos metabólitos.....	39
4.3.3 Parâmetros da injeção no GC-MS.....	40
4.3.4 Processamento dos dados	41
4.3.4 Análises estatísticas.....	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Cinética de encistamento de <i>Acanthamoeba castellanii</i> em salina de Neff	42
5.2 Análise metabolômica do encistamento de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	43
5.2.1 O método analítico apresentou reprodutibilidade e permitiu identificar 22 metabólitos.....	43

5.2.2 A análise metabolômica diferencia os estágios de trofozoítos e cistos.....	45
5.2.3 As diferenças no perfil metabólico foram significativas na comparação entre dois tempos.....	50
5.2.4 O enriquecimento indicou vias metabólicas de biossíntese, metabolismo e de transportadores ABC.....	54
6 DISCUSSÃO.....	57
7 CONCLUSÃO.....	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários potencialmente patogênicos encontrados de forma ubíqua na natureza. Estão incluídas nesse grupo as amebas do gênero *Acanthamoeba*, que constituem o gênero mais frequente entre as AVL (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). *Acanthamoeba* já foi isolada em ambientes distintos, como o solo, amostras de ar, sistemas de ar condicionado, poeira e equipamentos hospitalares (CLARKE; NIEDERKORN, 2006). Tratam-se de patógenos oportunistas, podendo causar graves infecções ao ser humano, como a ceratite amebiana (CA) e a encefalite amebiana granulomatosa (EAG). A CA consiste em uma infecção da córnea que, em geral, acomete indivíduos saudáveis, podendo levar à perda parcial ou total da visão. Sua ocorrência está relacionada ao uso de lentes de contato e o tratamento pode ser muito prolongado e difícil (LORENZO-MORALES *et al.*, 2013a). Na EAG, as formas evolutivas invadem o sistema nervoso central causando uma grave infecção de alta mortalidade, geralmente em indivíduos imunocomprometidos (KHAN, NAVEED AHMED; SIDDIQUI, 2011). Por se tratarem de infecções relativamente raras, quando comparadas àquelas causadas por outros patógenos, é comum o diagnóstico tardio ou mesmo equivocado, o que pode levar à piora do estado clínico e agravamento da infecção.

Diversos fatores estão relacionados à gravidade das infecções causadas por *Acanthamoeba* e seu difícil tratamento, sendo um dos mais importantes a capacidade desse parasito se transformar em cistos, formas extremamente resistentes, perante condições adversas do ambiente. A presença de cistos nos tecidos infectados dificulta o tratamento das infecções, uma vez que são resistentes aos medicamentos usados e a permanência de poucos cistos pode levar à recrudescência da infecção, ficando clara a importância dos estudos do processo de encistamento de *Acanthamoeba* (MOON *et al.*, 2008). As pesquisas envolvendo esse processo abrangem, principalmente, níveis morfológicos e bioquímicos e, apesar de recentemente os estudos moleculares terem recebido maior destaque, ainda é incompleta a compreensão do encistamento (FOUQUE *et al.*, 2012). A compreensão desse processo pode, dessa forma, auxiliar no tratamento adequado ou mesmo na elucidação de vias que podem ser utilizadas como alvo terapêutico.

Nos últimos anos, as ferramentas ômicas tem se desenvolvido devido à deficiência da genômica na previsão e compreensão dos fenótipos dos organismos (ALBERGHINA; WESTERHOFF, 2005). Essas ferramentas tem a função de identificar um grupo completo de biomoléculas em uma matriz biológica através de tecnologias experimentais, gerando dados que são então avaliados por ferramentas de bioinformática e bioestatística (KLASSEN *et al.*, 2017). Dentre as ferramentas ômicas, destaca-se a metabolômica, que tem a finalidade de avaliar o conjunto de metabólitos gerados em um certo organismo. Tal metodologia é de fundamental relevância, uma vez que se trata da ciência ômica mais relacionada com o fenótipo do organismo avaliado (TRIVEDI; HOLLYWOOD; GOODACRE, 2017). Os estudos metabolômicos nunca foram empregados às amebas do gênero *Acanthamoeba* e podem, dessa forma, ajudar na elucidação do processo de encistamento desse protozoário.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico do gênero *Acanthamoeba* e classificação taxonômica

As amebas de vida livre (AVL) do gênero *Acanthamoeba* foram inicialmente descritas na década de 1930, por Castellani, quando este observou o crescimento desses protozoários em uma cultura do fungo *Cryptococcus pararoseus*. Devido à presença de pseudópodes nos trofozoítos e dos seus cistos exibirem uma parede dupla, esses organismos foram inicialmente incluídos no gênero *Hartmannella*, tendo sido nomeados como *Hartmannella castelanii*. Volkonsky, em 1931, dividiu o gênero *Hartmannella* em três subgêneros: *Hartmannella*, *Glaeseria* e *Acanthamoeba*, sendo o último caracterizado pela presença de fusos pontiagudos durante a mitose e um cisto de parede dupla com uma camada externa irregular.

Algumas décadas depois, Singh (1952) e Singh e Das (1970) questionaram a classificação dessa ameba apenas por suas características morfológicas e aparência dos cistos, alegando que estas seriam de baixo valor filogenético. Em 1966, Pussard concordou com Singh (1952) que a forma descrita dos trofozoítos era pouco satisfatória para a determinação da espécie, mas que a morfologia distinta do cisto poderia ser uma característica decisiva do gênero *Acanthamoeba*.

Após avaliar diversas cepas de *Hartmannella* e *Acanthamoeba*, Page (1967) também concluiu que a forma dos fusos mitóticos era duvidável na diferenciação de espécies, porém, que a presença de acantopódios e as características dos cistos eram suficientes para a classificação de gênero. Em 1975, Sawyer e Griffin estabeleceram a família Acanthamoebidae (KHAN, NAVEED AHMED, 2006). Em 1988, o gênero *Hartmannella* foi alocado na família Hartmannellidae e estabeleceu-se a atual classificação filogenética das amebas de vida livre (**Figura 1**).

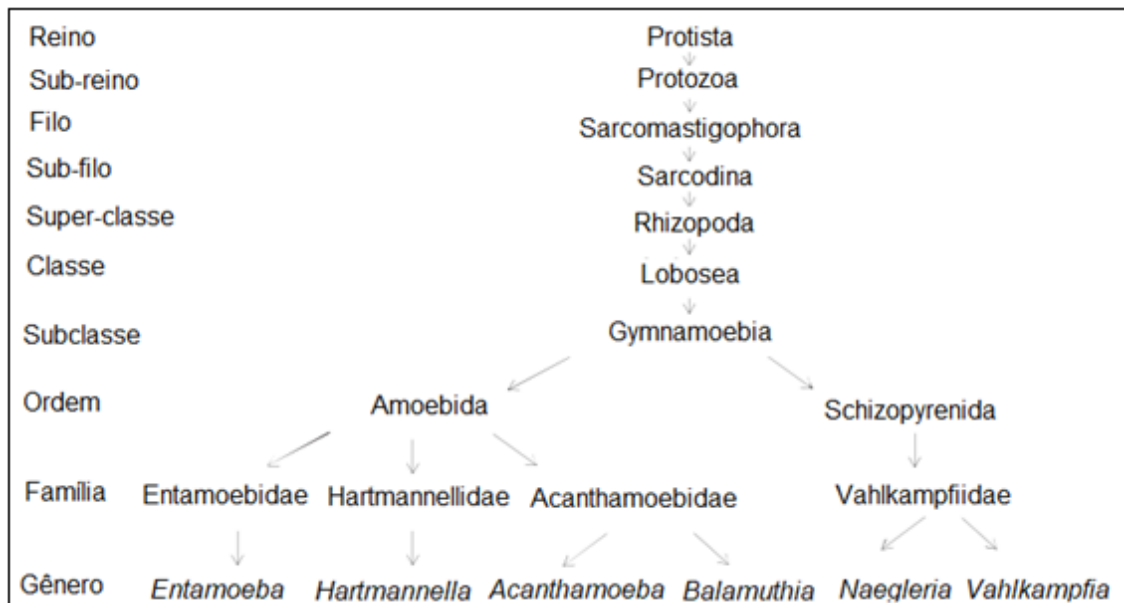


FIGURA 1. Atual classificação filogenética de *Acanthamoeba* em relação as outras amebas de vida livre. Fonte: adaptado de KHAN, 2006.

2.2 Morfologia e Biologia de *Acanthamoeba*

Após o seu descobrimento, as amebas do gênero *Acanthamoeba* foram ignoradas por décadas, porém, no final da década de 1950 foram isoladas como contaminantes de culturas de tecidos (JAHNES; FULLMER, 1957). Posteriormente, Culbertson *et al.* (1959) demonstraram pela primeira vez o potencial patogênico de *Acanthamoeba*, ao relatar o isolamento da mesma de tecidos provenientes de macacos e camundongos. Tais animais haviam sido inoculados com um fluido que supostamente continha um vírus não identificado, sendo que o suposto microrganismo foi identificado posteriormente como *Acanthamoeba*.

Acanthamoeba pode apresentar duas formas durante o seu ciclo de vida: a forma de trofozoíto, vegetativa, onde a alimentação e o metabolismo são ativos, assim como sua reprodução, que ocorre por fissão binária; e a forma de cisto, cuja formação é desencadeada por condições ambientais rigorosas para sua sobrevivência (KHAN, 2006).

Os trofozoítos são estruturas ameboides que medem entre 20-40µm, sendo que seu tamanho pode variar consideravelmente entre as espécies e genótipos diferentes. Os trofozoítos apresentam estruturas em forma de espinhos em sua superfície, conhecidas como acantopódios, cujas funções incluem adesão a superfícies inertes ou biológicas, captura de alimentos e movimentação (**Figura 2a**). Durante essa fase,

se alimentam ativamente de bactérias, algas e leveduras, sendo possível visualizar vários vacúolos digestivos em seu citoplasma. As amebas permanecem na forma de trofozoítos quando a oferta de alimentos é abundante, o pH se mantém neutro, a temperatura próxima de 30°C e osmolaridade entre 50-80 mOsm/L (KHAN, NAVEED AHMED, 2006; LORENZO-MORALES *et al.*, 2013a).

Quando expostos a condições rigorosas, como falta de alimento ou alterações excessivas de temperatura ou pH, ou mesmo quando expostos à componentes das soluções de manutenção de lentes de contato, os trofozoítos podem desenvolver-se em sua forma de resistência, os cistos (KHAN, NAVEED AHMED, 2006). Nesta forma a atividade metabólica é mínima e existe uma dupla parede (endocisto e ectocisto) que protege a ameba das condições externas (**Figura 2b**). Durante esta fase, os níveis celulares de RNA, proteínas, triglicerídeos e glicogênio são mínimos, o que leva a diminuição do volume celular (WEISMAN, 1976). O tamanho dos cistos varia entre 13 e 23µm (SIDDIQUI; KHAN, 2012).

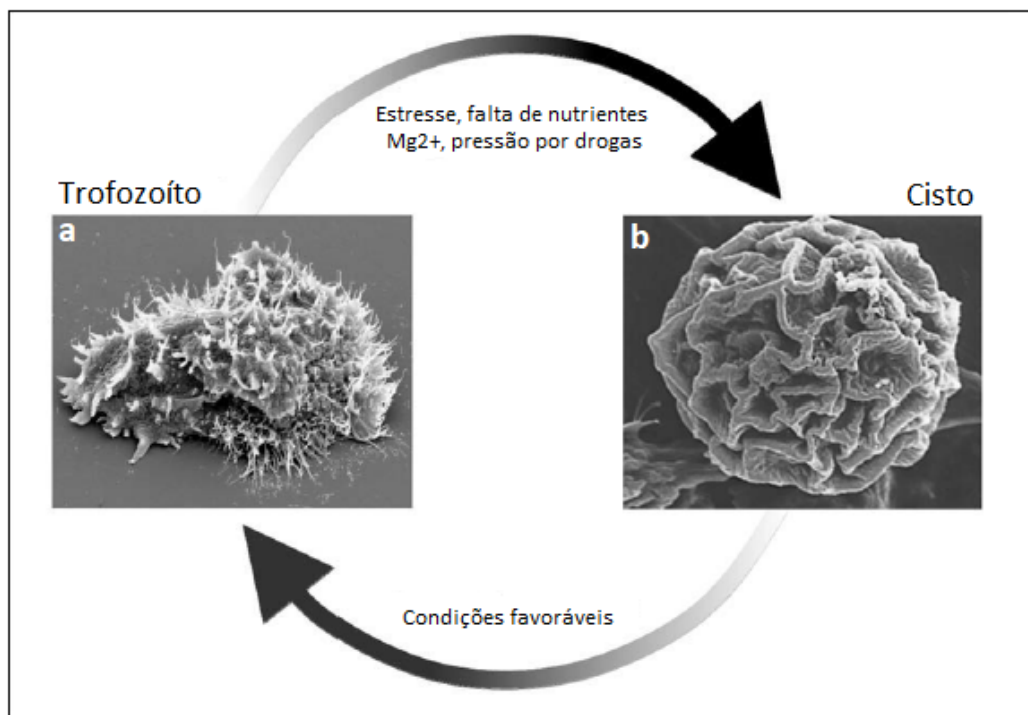


FIGURA 2. Formas evolutivas de *Acanthamoeba* spp. Quando se encontra em condições favoráveis, a ameba se mantém na forma de trofozoítos (a), enquanto em condições rigorosas desenvolve-se em sua forma de resistência, os cistos (b). Imagens de microscopia eletrônica. Fonte: adaptado de ROBERTS, HENRIQUEZ, 2010.

Mazur, Hadas e Iwanicka (1995) demonstraram que os cistos de *Acanthamoeba* podem manter sua integridade e conservar a patogenicidade durante vários anos em condições adversas, sendo este um importante fator na propagação de infecções causadas por esta ameba. O desencistamento, por sua vez, ocorre quando o cisto é exposto a condições ideais de crescimento para o trofozoíto, sendo essas alterações ambientais detectadas através de poros existentes na parede do cisto, conhecidos como ostíolos. O trofozoíto deixa então o cisto, separando-se da parede que o protegia, completando o ciclo (KHAN, NAVEED AHMED, 2006).

A parede externa dos cistos é composta majoritariamente de proteínas e polissacarídeos, enquanto a parede interna é constituída de celulose. As duas paredes são, geralmente, separadas por um espaço, exceto em alguns pontos, onde se formam os ostíolos. A composição da parede cística de *A. castellanii* de genótipo T4 foi descrita como contendo 33% de proteínas, 4-6% de lipídios, 35% de carboidratos (principalmente celulose), 8% de cinzas e 20% de materiais não identificados (HIRUKAWA, YUKIKO *et al.*, 1998b; NEFF; NEFF, 1969; TOMLINSON; JONES, 1962). Uma análise utilizando cromatografia gasosa combinada com espectrometria de massas demonstrou que a porção de carboidratos contém alta porcentagem de galactose e glicose, além de pequenas quantidades de manose e xilose (DUDLEY; JARROLL; KHAN, 2009a).

2.3 Distribuição ambiental de *Acanthamoeba*

Acanthamoeba é o gênero mais comum das amebas de vida livre (AVL) e está amplamente distribuído na natureza, além disso, estima-se também que possam ser os protozoários de vida livre mais comumente encontrados. Possui grande importância ecológica e pode ser encontrada em uma ampla variedade de habitats (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004).

Esses protozoários já foram isolados de ambientes como solo, água doce de lagos e rios (KHAN, PAGET, 2002), piscinas (AL-HERRAWY *et al.*, 2014), sistemas públicos de distribuição de água (XUAN *et al.*, 2017), sistemas de aquecimento de água hospitalares (BAGHERI *et al.*, 2010), água mineral engarrafada (MASCHIO *et al.*, 2015), água marinha (ARIAS FERNANDEZ *et al.*, 1989) e sistemas de ar condicionado (CHAN *et al.*, 2011). Além disso, há registros de sua presença em soluções de limpeza de lentes de contato (TZANETOU *et al.*, 2006). No homem,

podem ser encontradas no nariz (CRUZ; RIVERA, 2014), na pele (MURAKAWA, 1995) e sistema nervoso central (AICHELBURG *et al.*, 2008) de pacientes imunocomprometidos.

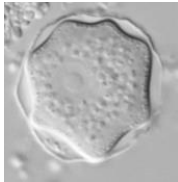
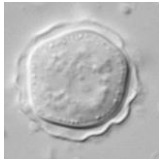

Segundo estudos, mais de 80% da população aparentemente saudável apresenta anticorpos contra *Acanthamoeba spp*, podendo estes serem detectados no soro de humanos e animais devido a ampla distribuição desse protozoário na natureza e intenso contato com populações humanas, sugerindo que as infecções podem ser comuns, porém autolimitadas em hospedeiros competentes (CHAPPELL *et al.*, 2001).

2.4 Classificação morfológica e molecular do gênero *Acanthamoeba*

A determinação de um único critério taxonômico para a classificação de *Acanthamoeba* é de grande dificuldade, por isso, Pussard e Pons (1977) propuseram a divisão do gênero de acordo com as características morfológicas dos cistos. Este critério ajudou na organização do crescente número de isolados descritos na época. As 18 espécies de *Acanthamoeba* descritas até aquele momento foram classificadas em três grupos denominados I, II e III (**Tabela 1**). Durante muitos anos, essa classificação foi a mais adequada e utilizada para identificação e taxonomia do gênero (KHAN, 2006; VISVESVARA, G.S.; SCHUSTER, 2008).

Apesar da classificação de grupos ainda ser utilizada em trabalhos descritivos, atualmente, a metodologia mais aplicada na identificação e nos estudos taxonômicos de *Acanthamoeba* baseia-se na sequência do gene 18S rDNA. Ao analisar essa sequência em 53 isolados de *Acanthamoeba*, Stothard *et al.* (1998) puderam determinar pela primeira vez a classificação desse gênero em 12 genótipos (T1 a T12). Cada genótipo exibe ao menos 5% de divergência genética dos outros genótipos e, segundo Corsaro e Venditti (2010), existem 12 regiões variáveis na região 18S do rRNA, sendo que todas devem ser consideradas para a determinação de um novo genótipo. Desde a classificação proposta por Stothard *et al.* (1998), oito novos genótipos foram descritos (T13 a T20) (CORSARO *et al.*, 2015; MAGNET; HENRIQUES-GIL; GALVÁN-DIAZ; *et al.*, 2014).

Tabela 1 - Classificação morfológica dos cistos de *Acanthamoeba*

	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Diâmetro dos cistos	16 a 30µm	≥ a 18µm	≥ a 18µm
Forma do endocisto	Aspecto estrelado, braços bem visíveis	Levemente estrelado, oval ou poliédrico	Oval ou levemente angular
Forma do ectocisto	Contorno circular, liso ou levemente ondulado	Segue o contorno do endocisto, ondulado ou irregular	Fino e liso ou fracamente ondulado, justaposto ao endocisto
Imagem do cisto			

Fonte: adaptado de KHAN, 2006; VISVESVARA e SCHUSTER, 2008; LORENZO-MORALES, KHAN, WALOCHNIK, 2015b.

A maioria das infecções causadas por esse gênero – 90% dos casos de ceratite e grande parte dos casos de encefalite amebiana granulomatosa (EAG) – estão relacionadas ao genótipo T4. As causas para essa prevalência são incertas, entretanto, acredita-se que amebas desse genótipo possuam maior virulência e propriedades que aumentam sua capacidade de infecção, assim como maior resistência a agentes quimioterápicos (SIDDIQUI; KHAN, 2012). Diversos estudos tentam correlacionar patogenicidade a genótipos específicos, e um estudo realizado por Booton *et al.* (2005) mostrou que 72% dos casos analisados pertenciam ao genótipo T4 (BOOTON *et al.*, 2005; MAGHSOOD *et al.*, 2005).

2.5 Infecções causadas por *Acanthamoeba*

A presença de *Acanthamoeba* nos mais variados ambientes favorece o contato direto com populações humanas e animais. Tratando-se de uma ameba anfizóica, pode sobreviver no ambiente e, oportunisticamente, causar infecções ao homem. As possíveis vias de entrada de *Acanthamoeba* no organismo são a pele, o trato respiratório e a córnea (**Figura 3**) (LORENZO-MORALES *et al.*, 2013b). Este protozoário é o agente etiológico da ceratite por *Acanthamoeba* (CA), doença extremamente dolorosa que atinge a córnea de indivíduos saudáveis, e da encefalite amebiana granulomatosa, doença quase sempre fatal que atinge o sistema nervoso central de indivíduos imunocomprometidos. Além disso, já foi associada a lesões cutâneas e sinusite em pacientes imunocomprometidos (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

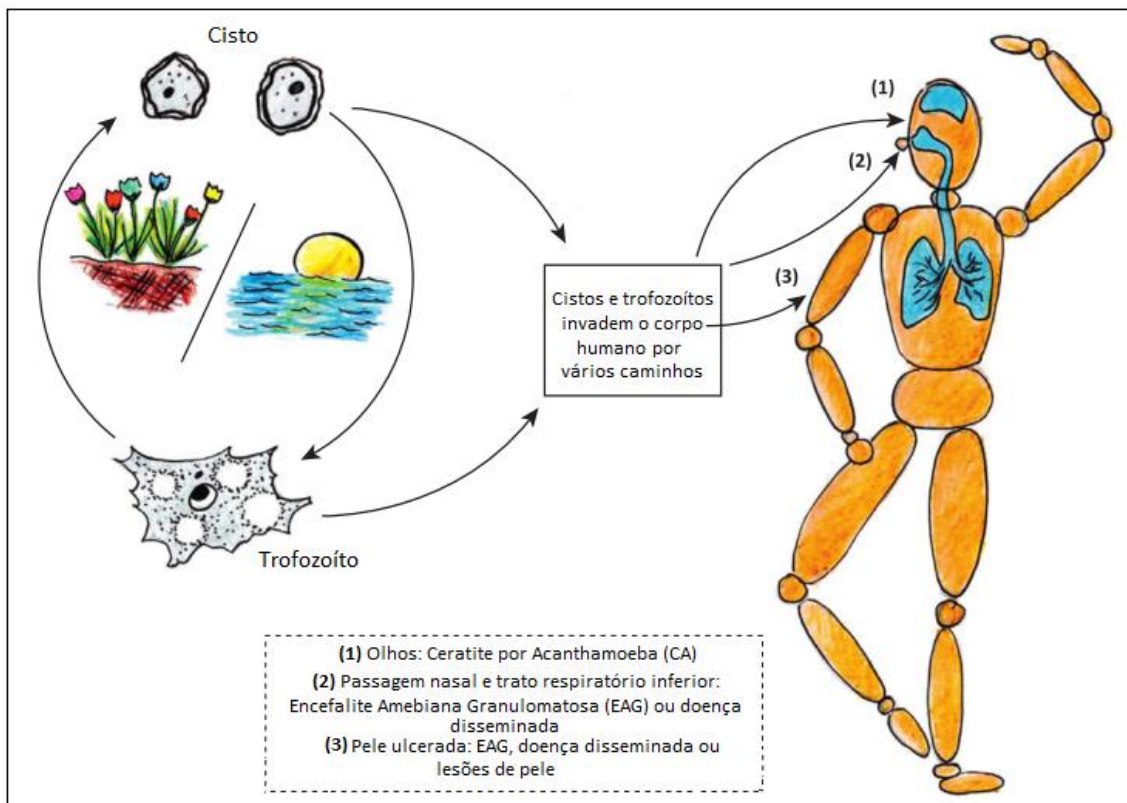


FIGURA 3. Formas evolutivas de *Acanthamoeba* spp, vias de entrada no corpo humano e as doenças associadas. Fonte: adaptado de LORENZO-MORALES *et al.*, 2013.

Em humanos, os primeiros dois casos de ceratite por *Acanthamoeba* foram reportados por Nagington *et al.* (1974), sendo o primeiro caso de uma mulher sem histórico de trauma nos olhos, apresentando sintomas característicos de ceratite por *Acanthamoeba* (CA) e, após alguns meses de tratamento sem resultados satisfatórios, foi submetida a um transplante de córnea. O segundo caso relatado por Nagington *et al.* (1974) diz respeito a um homem que desenvolveu ceratite meses após ferir um dos olhos em um galho de árvore, desenvolvendo CA que, devido à sua gravidade, resultou em enucleação do olho. O primeiro caso de Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) foi descrito por Jager e Stamm (1972), que relataram o caso de um homem em tratamento de doença de Hodgkin internado após um episódio convulsivo, apresentando fraqueza muscular nos membros e espasmos musculares. Dias após a internação o paciente evoluiu para óbito, sem diagnóstico, sendo este definido após a visualização de amebas em cortes histológicos de lesões granulomatosas e hemorrágicas encontradas no cérebro.

2.5.1 Ceratite por *Acanthamoeba* (CA)

A infecção da córnea causada por esta ameba é denominada ceratite amebiana ou ceratite por *Acanthamoeba* (CA) e trata-se da infecção mais recorrente causada por este protozoário, podendo afetar apenas um ou ambos os olhos. A infecção acomete pacientes imunocompetentes e a incidência é semelhante entre homens e mulheres (CLARKE, D. W.; NIEDERKORN, 2006).

Os primeiros registros de CA foram publicados em meados da década de 1970, com casos registrados no Reino Unido (NAGINGTON *et al.*, 1974). A partir de 1980, houve um aumento significativo no número de casos dessa infecção, o que ocorreu devido à ampliação do número de usuários de lentes de contato neste período (LORENZO-MORALES *et al.*, 2013). O primeiro caso registrado de CA em um usuário de lentes de contato ocorreu em 1984, quando um paciente relatou ter utilizado uma banheira da qual *Acanthamoeba* foi isolada (COHEN *et al.*, 1985).

O uso de soluções salinas feitas com sal de cozinha para a limpeza das lentes de contato apresentou-se como um fator de risco importante no desenvolvimento dos primeiros casos (STEHR-GREEN *et al.*, 1987). Atualmente, vários fatores de predisposição estão associados ao desenvolvimento desta infecção, como o uso de lentes de contato por longos períodos, falta de higiene pessoal, limpeza e manutenção inadequada das lentes, formação de biofilme na superfície das lentes e exposição à

água contaminada (SIDDIQUI; KHAN, 2012). Além disso, pequenos traumas na córnea são um pré-requisito para o desenvolvimento de ceratite, sendo esta supostamente incapaz de se estabelecer em córneas íntegras (NIEDERKORN *et al.*, 1999).

Estima-se que o número de usuários de lentes de contato em todo o mundo gire em torno de 120 milhões de pessoas, tendendo este número a aumentar. O uso de lentes de contato é um importante fator de risco para o desenvolvimento de CA, possuindo os usuários uma chance 80 vezes maior de desenvolverem ceratite do que aqueles que não utilizam lentes (KHAN, 2006). A incidência de CA varia muito entre diferentes regiões geográficas, porém, essa variação não reflete a distribuição de *Acanthamoeba*, uma vez que a infecção ocorre devido ao uso prolongado de lentes de contato por parte da população, falta de atenção aos riscos do uso indiscriminado de lentes ou condições locais que favorecem o crescimento de amebas patogênicas (KHAN, 2006). Atualmente, é possível encontrar relatos de casos de CA em diversos países em todo o mundo, o que mostra sua ampla distribuição (ARNALICH-MONTIEL *et al.*, 2014; GRAFFI *et al.*, 2013; LALITHA *et al.*, 2012).

No Brasil, diversos trabalhos recentes têm reportado casos de CA, como Duarte *et al.* (2013), Marujo *et al.* (2013) e Sticca *et al.* (2017), reiterando a importância dessa infecção a nível nacional.

Os sinais e sintomas da CA se assemelham aos sintomas de ceratite causada por outros patógenos, o que pode levar a diagnósticos incorretos. Os pacientes relatam dor ocular intensa, sensação de haver algo estranho no olho, vermelhidão do olho, visão turva, fotofobia, entre outros sintomas. Os sinais observados incluem lacrimejamento excessivo, edema, infiltrado estromal e ceratoneurite radial, causada pelo acúmulo de trofozoítos em torno dos nervos da córnea, causando dor extrema (**Figura 4a**). Essas alterações podem durar de semanas a meses, e, em casos avançados, pode ocorrer na córnea a formação de um abscesso característico em forma de anel (**Figura 4b**), resultado da ação inflamatória na região. Após a formação do abscesso, outras complicações podem ocorrer, como glaucoma, catarata, perfuração da córnea e infecções microbianas secundárias (DART; SAW; KILVINGTON, 2009; LORENZO-MORALES *et al.*, 2013b).

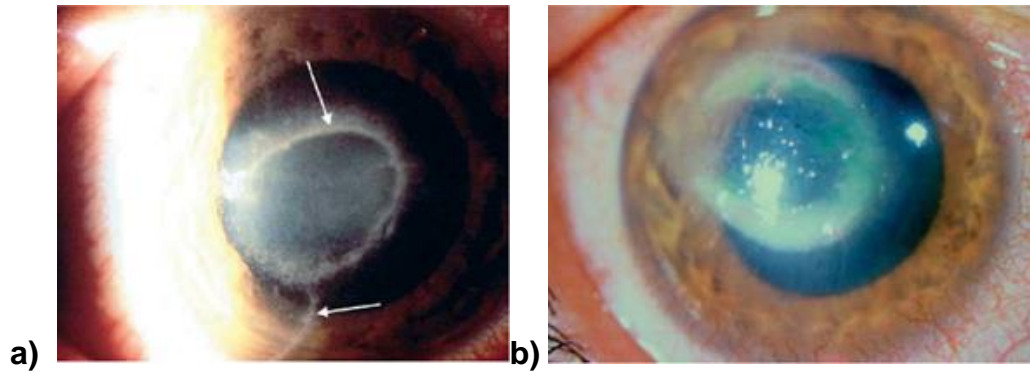


FIGURA 4. Aparência clínica da ceratite por *Acanthamoeba*. (a) Os trofozoítos geralmente se agrupam em torno de nervos da córnea, produzindo ceratoneurite radial (setas). (b) Lesão em forma de anel característica de ceratite amebiana. Fonte: CLARKE; NIEDERKORN, 2006.

A sequência de eventos que desencadeia a CA envolve a invasão do estroma pelos trofozoítos, diminuição do número de fibroblastos, indução de uma intensa resposta inflamatória e finalmente necrose do estroma, com consequências como cegueira (SIDDQUI; KHAN, 2012). Por outro lado, testes em lentes de contato usadas mostraram a presença de diversos sacarídeos após apenas 30 minutos de uso, podendo estes agir como receptores para trofozoítos de *Acanthamoeba*, aumentando a probabilidade de ocorrer ligação das amebas às lentes de contato (KLOTZ; MISRA; BUTRUS, 1987).

Pelo menos oito espécies do gênero *Acanthamoeba* já foram relacionadas a casos de ceratite em humanos, sendo as mais relevantes *Acanthamoeba castellani*, *Acanthamoeba polyphaga* e *Acanthamoeba culbertsoni*. A identificação da espécie por critérios morfológicos não é amplamente utilizada e pesquisadores têm preferido identificá-las por seus genótipos (MAGNET; HENRIQUES-GIL; GALVÁN-DIAZ; *et al.*, 2014; NIEDERKORN *et al.*, 1999).

O diagnóstico da CA deve ser feito através da observação dos sintomas clínicos e demonstração da presença de amebas (DART; SAW; KILVINGTON, 2009). É comum o diagnóstico ser feito erroneamente como infecção por *Herpes simplex vírus*, apesar do uso de lentes de contato e dor excruciante serem fortes indicativos de infecção por *Acanthamoeba*. O isolamento da ameba pode ser feito nos estojos das lentes, nas lentes ou na própria córnea. Para fins de identificação, alguns métodos estão disponíveis, como microscopia de luz, microscopia confocal ou PCR, sendo o último um método altamente específico e sensível, capaz de detectar a presença de uma quantidade muito pequena de amebas (DART; SAW; KILVINGTON, 2009;

SCHROEDER *et al.*, 2001). Testes sorológicos não têm valor diagnóstico, uma vez que anticorpos para *Acanthamoeba* também são encontrados em pessoas aparentemente saudáveis, devido à ubiquidade desse protozoário (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015a).

Os trofozoítos de *Acanthamoeba* são sensíveis a muitos agentes quimioterápicos, como antibióticos, antissépticos, antifúngicos e antiprotozoários, incluindo metronidazol. A persistência das infecções, no entanto, está relacionada à presença de cistos, sobre os quais poucos medicamentos têm algum efeito. O tratamento tem como objetivo a erradicação de todos os trofozoítos e cistos viáveis e rápida resolução da resposta inflamatória. As diamidinas e biguanidas são atualmente as drogas anti-amebianas mais eficientes contra cistos em estudos *in vitro* e o esquema terapêutico para tratamento de CA mais eficaz tem sido o uso tópico dessas drogas (MARTÍN-NAVARRO *et al.*, 2013; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004). Polihexametileno biguanida (PHMB) 0,02% a 0,06% e clorexidina 0,02% a 0,2% têm sido biguanidas comumente utilizadas. Essas drogas levam ao rompimento da membrana plasmática e danos às enzimas respiratórias. O PHMB e a clorexidina possuem toxicidade relativamente baixa, o que favorece seu uso como tratamento de primeira linha, porém, há evidências de resistência de alguns organismos (DART; SAW; KILVINGTON, 2009; MAYCOCK; JAYASWAL; ED, 2016).

Um estudo envolvendo 218 pacientes no Reino Unido mostrou que a média de tempo do tratamento é de seis meses (RADFORD; MINASSIAN; DART, 2002). Além disso, problemas secundários à infecção por *Acanthamoeba*, como limbite e esclerite, podem exigir o acréscimo de outras drogas ao esquema terapêutico (LEE, G. A. *et al.*, 2002). Casos graves com perfuração da córnea ou abscessos fulminantes podem exigir transplantes de córnea, podendo ocorrer recidivas da infecção após vários meses (DART *et al.*, 2009).

2.5.2 Encefalite Amebiana Granulomatosa

A encefalite amebiana granulomatosa (EAG) é uma infecção crônica e progressiva do sistema nervoso central (SNC) e, embora seja extremamente rara, é quase sempre fatal. Trata-se de uma doença oportunista, atingindo majoritariamente indivíduos imunologicamente comprometidos, como alcoolistas, doentes crônicos, usuários de drogas, pacientes submetidos a tratamentos imunossupressores e portadores do vírus HIV (SIDDIQUI; KHAN, 2012; VISVESVARA, GOVINDA S.;

MOURA; SCHUSTER, 2007). Para esses pacientes, os fatores de risco incluem contato com água contaminada em locais como em piscinas, praias ou solos. Em contrapartida, Webster *et al.* (2012) relataram o raro caso de um paciente imunocompetente que desenvolveu EAG, sobrevivendo à infecção após três meses de internação. O número de mortes aproximado associadas à EAG corresponde a 1,57 a cada 10.000 mortes por HIV/AIDS (KHAN, 2006).

As rotas de entrada de *Acanthamoeba* no SNC são de difícil determinação, presumindo-se que a rota primária de entrada se dá pelo trato respiratório inferior, com invasão do espaço intravascular, seguida da disseminação por via hematogênica e quebra da barreira hematoencefálica. Lesões cutâneas podem levar ao acesso direto da circulação sanguínea pelas amebas. Além disso, a entrada de *Acanthamoeba* pode acontecer através das vias aéreas superiores e invasão do SNC via neuroepitélio olfatório (SIDDIQUI *et al.*, 2011).

Outras infecções envolvendo *Acanthamoeba* incluem a nasofaríngea e, mais frequentemente, cutânea. As infecções cutâneas são caracterizadas por nódulos e ulcerações da pele, onde é possível encontrar trofozoítos e cistos. Em indivíduos saudáveis essas infecções são muito raras e autolimitadas, mas em indivíduos imunologicamente comprometidos isso fornece uma porta de entrada para o sistema circulatório, com disseminação hematogênica e possíveis consequências fatais. Infecções cutâneas e EAG podem ocorrer independentemente ou associadas (**Figura 5**) (KHAN, 2006). O neuroepitélio olfatório oferece outra porta de entrada para o sistema nervoso central e tem sido estudada em modelos experimentais (MARTINEZ; VISVESVARA, 1997).



FIGURA 5. Lesões cutâneas causadas por *Acanthamoeba*. As lesões podem servir como porta de entrada para o protozoário atravessar a barreira hematoencefálica após se disseminar por via hematogênica, causando encefalite amebiana granulomatosa. Fonte: MCKELLAR *et al.*, 2006.

Os sinais e sintomas da EAG são semelhantes a outras infecções do SNC causadas por outros microrganismos, incluindo dor de cabeça, febre, mudanças comportamentais, hemiparesia, letargia, endurecimento do pescoço, agitação, afasia, ataxia, fotofobia, vômitos, náusea e aumento da pressão intracraniana (BAIG; KHAN, 2015; MARTINEZ, 1991). As fases mais avançadas da doença são irreversíveis, sendo comum a perda de consciência e coma, que eventualmente levam à morte. Enquanto outras infecções por *Acanthamoeba* podem durar meses, a EAG pode ter um desfecho fatal em dias ou semanas (KHAN, NAVEED AHMED; SIDDIQUI, 2011).

Os dados de necropsias de pacientes mortos por EAG demonstram extensas áreas de necrose hemorrágica e edema intenso (**Figura 6**) (SIDDIQUI e KHAN, 2012). Os mecanismos associados com sua patogênese são incertos, mas as complicações patofisiológicas envolvendo o SNC incluem indução de resposta inflamatória, invasão da barreira hematoencefálica e tecidos conectivos e danos neuronais, levando a disfunção cerebral. Pacientes com a resposta imune muito comprometida não desenvolvem a forma granulomatosa típica da doença, ou a desenvolvem de forma branda (MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003; KHAN, 2003).

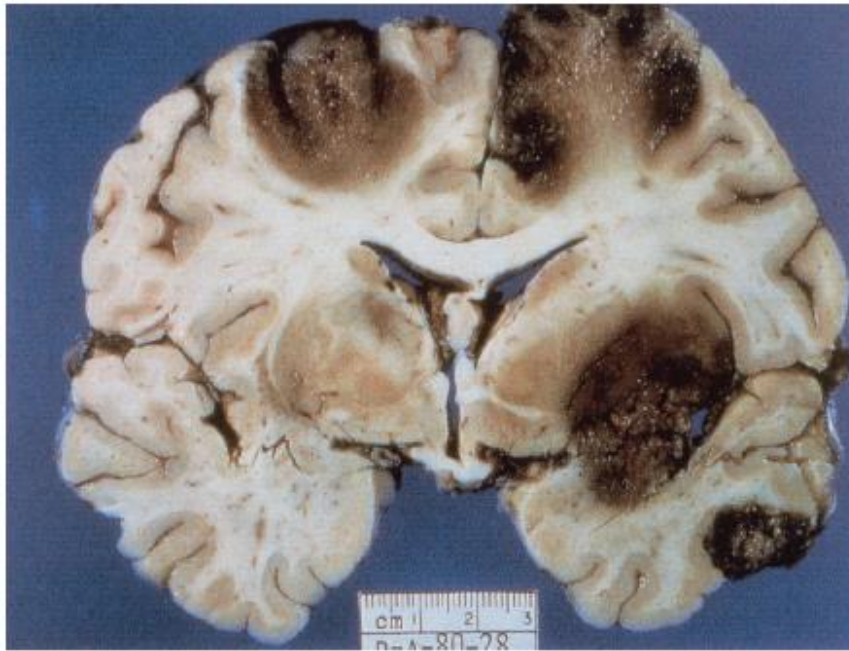


FIGURA 6. Corte coronal do cérebro mostrando extensa necrose cortical e subcortical em um caso fatal de Encefalite Amebiana Granulomatosa. Fonte: MARTINEZ, 1982.

O diagnóstico de EAG em sua forma granulomatosa pode ser auxiliado por exames de imagem, como ressonância magnética e tomografia computadorizada, que podem indicar áreas de lesão, abscessos e necrose no SNC. A confirmação do diagnóstico, no entanto, é realizada pela demonstração de *Acanthamoeba* em amostras de biópsia proveniente do tecido cerebral cultivado em meio de cultura de crescimento para amebas ou por visualização direta em cortes histopatológicos (MARTINEZ; VISVESVARA, 1991). Altos níveis de anticorpos específicos para *Acanthamoeba* no soro é um indicativo de EAG e podem ser demonstrados por imunofluorescência. Pacientes gravemente imunocomprometidos, no entanto, podem não desenvolver altos títulos de anticorpos ou granulomas, devendo-se levar em conta outros fatores para o diagnóstico correto (KHAN, 2006).

Não existe um esquema terapêutico recomendado e a maioria dos casos é diagnosticada em estágio *post mortem*. A falta de fármacos antiamebianos associada à seletividade da barreira hematoencefálica levam a uma taxa de mortalidade superior a 90% (SIDDIQUI e KHAN, 2012). Existem, no entanto, raros relatos de tratamento de EAG que cursaram com sobrevivência do paciente. Webster *et al.*, (2012) registraram o caso de um soldado imunocompetente diagnosticado com a doença e tratado com voriconazol e miltefosina por três meses, com sucesso. Apesar disso, os autores

ressaltam que o êxito no tratamento se deve provavelmente ao início precoce da medicação, debridações cirúrgicas e a própria condição imunológica do paciente. Outros relatos de tratamentos eficazes incluem o uso de trimetropim/sulfametoxazol, rifampicina, fluconazol, dexametasona, entre outros medicamentos (LACKNER *et al.*, 2010; MARITSCHNEGG *et al.*, 2011).

2.6 Processo de encistamento de *Acanthamoeba*

O estudo do processo de encistamento em *Acanthamoeba* é antigo e abrange, principalmente, níveis morfológicos e bioquímicos. Recentemente, estudos celulares e moleculares têm levado a um melhor entendimento do processo, apesar deste ainda ser consideravelmente incompleto (FOUQUE *et al.*, 2012).

Diferentes sinais externos podem iniciar o processo de encistamento, como a ausência de nutrientes (NEFF *et al.*, 1964) e estresse osmótico induzido por componentes como sais e glicose (CORDINGLEY; WILLIS; VILLEMEZ, 1996; DUDLEY *et al.*, 2005). O encistamento também é eficientemente induzido por íons magnésio e taurina em ágar não-nutriente (RAIZADA; MURTI, 1971), sendo que estes levam à síntese de AMP cíclico (cAMP) que, por sua vez, é um indutor do encistamento. A indução da síntese de cAMP pode ocorrer devido à ativação da adenilato ciclase, responsável pela transformação de ATP em cAMP, ou inibição da fosfodiesterase. Essa informação foi corroborada por um estudo que mostrou que a inibição da fosfodiesterase causou indução do encistamento (RAIZADA; MURTI, 1972).

Alguns trabalhos propuseram o envolvimento de algumas vias de sinalização no encistamento de *Acanthamoeba*. A proteína farnesiltransferase (FPT III), um inibidor da farnesilação de Ras, reduziu a taxa de encistamento (DUDLEY; JARROLL; KHAN, 2009a). Ras é uma pequena GTPase envolvida na ativação da via da MAP quinase (MAPK). Esses resultados mostram que esta via deve estar envolvida no encistamento, mas os seus componentes ainda devem ser descritos, incluindo os seus receptores de membrana. Compreender as vias de sinalização é de extrema importância no entendimento dos mecanismos de encistamento das amebas de vida livre, levando em conta que diferentes vias podem ser ativadas por diferentes sinais.

O processo de encistamento está associado a mudanças morfológicas, portanto, é esperado que ocorra rearranjo do citoesqueleto. Estudos recentes

demonstraram o controle da síntese de actina durante o encistamento, além de degradação da mesma nas fases iniciais (LEITSCH *et al.*, 2010). Além disso, demonstrou-se a inibição do encistamento na presença de um inibidor da polimerização da actina (DUDLEY *et al.*, 2009). Tais resultados confirmam a importância do rearranjo do citoesqueleto no encistamento. Durante o processo de encistamento, observa-se a formação de uma forma de pré-cisto (**Figura 7**), na qual estão praticamente ausentes os acantopódios, estruturas características dos trofozoítos, além do início da formação da parede cística (CHÁVEZ-MUNGUÍA *et al.*, 2013).

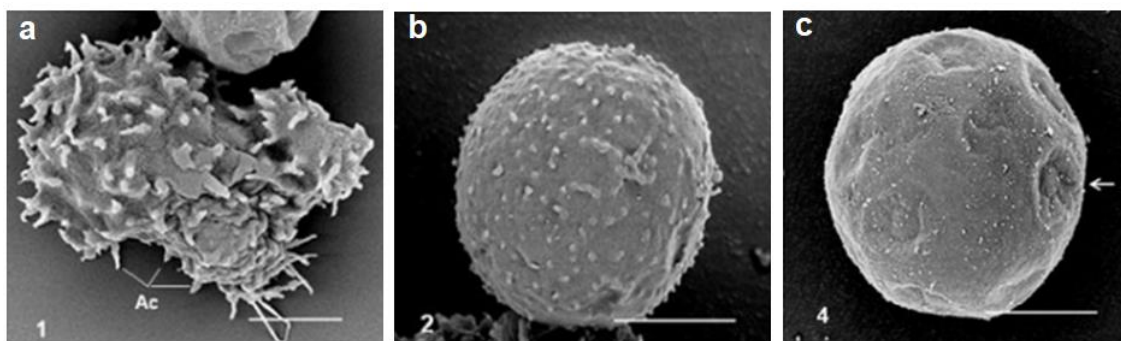


FIGURA 7. Microscopia eletrônica das formas de *Acanthamoeba*. Durante o processo de encistamento, ocorre a perda de estruturas morfológicas e a formação de outras. **(a)** trofozoíto apresentando acantopódios; **(b)** forma pré-cística, no qual desaparecem os acantopódios e inicia-se a formação da parede cística; **(c)** cisto maduro com as paredes completamente formadas e presença de ostíolos (setas). Fonte: CHÁVEZ-MUNGUÍA *et al.*, 2013.

Provavelmente, diferentes proteases estão envolvidas no encistamento e desencistamento de *Acanthamoeba*. A relação de serino proteases com esse processo já foi descrita, uma vez que seu mRNA correspondente foi expresso durante o encistamento (MOON, E.-K. *et al.*, 2008). Além disso, a inibição de uma serino protease por mimivírus bloqueia o encistamento, demonstrando a importância dessas proteases na diferenciação de *Acanthamoeba* em cistos (BORATTO *et al.*, 2015). A presença de serino proteases também já foi relatada especificamente em cistos (PARK; JEONG; AHN, 2002a). Cisteíno proteases também foram descritas recentemente como envolvidas no encistamento de *Acanthamoeba*, uma vez que esta protease teve sua expressão detectada especialmente nas fases iniciais do processo.

O uso de inibidores da ação de cisteíno proteases reduziu parcialmente o encistamento de *Acanthamoeba* (LEITSCH *et al.*, 2010).

A primeira alteração molecular em amebas de vida livre durante o encistamento é a expressão de CSP21 (*cyst specific protein of 21kDa*), uma proteína hidrofílica produzida nos estágios iniciais do encistamento e associada à parede dos cistos (HIRUKAWA *et al.*, 1998). Apesar de sua expressão ser exclusiva da forma cística, sua função ainda não foi estabelecida (MOON *et al.*, 2008).

Cistos são mais resistentes aos tratamentos que os trofozoítos, provavelmente devido às propriedades de suas paredes. Como estas são compostas parcialmente de celulose, especula-se que a inibição da síntese desta possa induzir uma maior sensibilidade aos quimioterápicos. Um estudo testou um inibidor da síntese de celulose (2,6-diclorobenzonitrila) e mostrou que esse inibidor bloqueia o encistamento, podendo favorecer o tratamento subsequente das infecções por *Acanthamoeba* (DUDLEY; ALSAM; KHAN, 2007).

2.7 As ferramentas ômicas no estudo da diversidade molecular de *Acanthamoeba*

Diversas ferramentas analíticas têm sido propostas nos últimos anos com o objetivo de avaliar como as biomoléculas afetam a funcionalidade dos organismos, ou seja, os processos biológicos como um todo (ALBERGHINA; WESTERHOFF, 2005). Imensos progressos na medicina foram alcançados com o avanço da genômica (COLLINS *et al.*, 2003), entretanto, a previsão e compreensão dos fenótipos dos organismos apenas pelo sequenciamento de seu DNA não ocorreu, o que levou ao desenvolvimento das ferramentas ômicas mais recentes.

As chamadas ferramentas ômicas tem a função de identificar um grupo completo de biomoléculas contido em uma matriz biológica através de tecnologias experimentais, gerando uma enorme quantidade de dados, avaliados com a ajuda de ferramentas de bioinformática e bioestatística (KLASSEN *et al.*, 2017). Dentre as ferramentas ômicas, destacam-se a genômica, a transcriptômica, proteômica e a metabolômica (**Figura 8**), que avaliam, respectivamente, o genoma, a expressão de transcritos, a concentração e a composição de proteínas e o conjunto de metabólitos gerados em um determinado organismo, sendo esta última a mais relacionada diretamente ao fenótipo do indivíduo (TRIVEDI; HOLLYWOOD; GOODACRE, 2017).

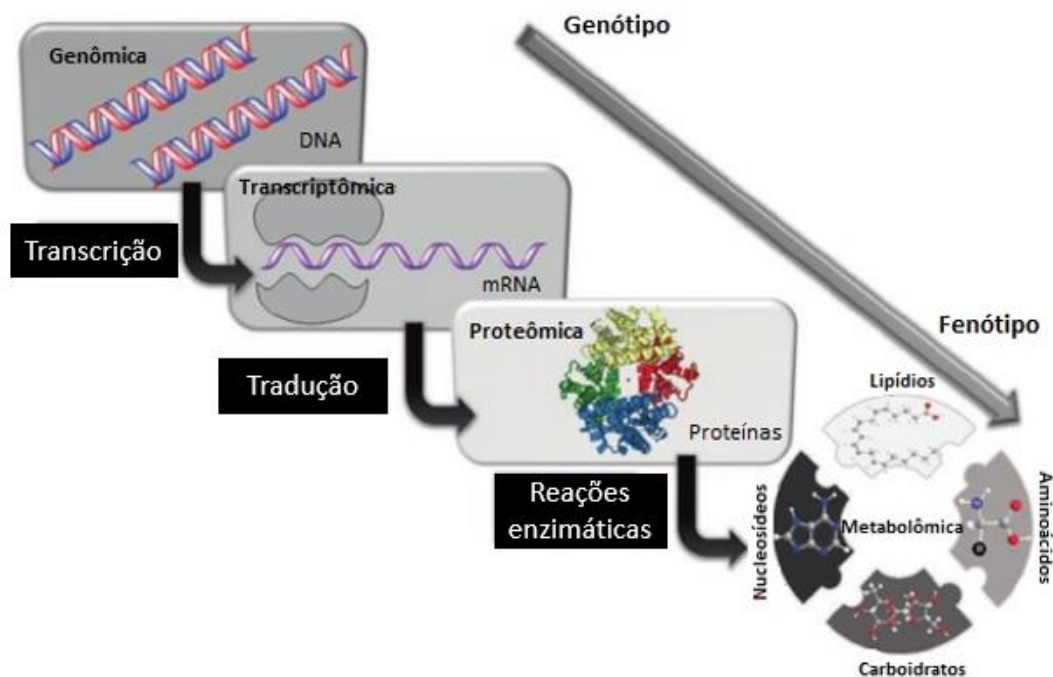


FIGURA 8. Correlação entre as ferramentas ômicas utilizadas nos estudos biológicos. Fonte: adaptado de KLASSEN *et al.*, 2017

Recentemente, Clarke *et al.* (2013) desenvolveram um projeto de sequenciamento genômico de *Acanthamoeba castellanii*, observando a existência de 15.455 genes ricos em íntrons, dos quais acredita-se que parte significativa tenha sido adquirida através de transferência lateral genética (TLG) inter-reinos. Além disso, o trabalho demonstrou a existência de um complexo repertório de sinalização e comunicação celular, incluindo ferramentas de sinalização da via da tirosina quinase completa.

Estudos proteômicos têm sido empregados para muitos protozoários, como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Leishmania donovani* (KUMAR *et al.*, 2014; LUNA-NÁCAR *et al.*, 2016; WAMPFLER *et al.*, 2014). Essas análises demonstraram a presença de proteínas expressas por espécies parasitas, ajudando no entendimento da relação destes com seus hospedeiros, na identificação de biomarcadores e possíveis alvos terapêuticos.

Até o momento, existem poucos estudos proteômicos envolvendo *Acanthamoeba*. Bouyer *et al.* (2009) avaliaram a expressão proteica durante a fase de encistamento, concluindo que as proteínas com a expressão alterada durante o encistamento estão envolvidas na dinâmica da actina, na glicólise e na proteólise.

Outro trabalho com foco no encistamento observou que o processo é dividido em duas fases, uma inicial, marcada pela autólise e degradação proteica, e uma fase tardia de restauração, acompanhada pela expressão de genes específicos do encistamento (LEITSCH *et al.*, 2010). Caumo *et al.* (2014), por sua vez, avaliaram o perfil proteico de trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga*, identificando 132 proteínas, incluindo proteínas de superfície e outras relacionadas à defesa. Huang *et al.* (2016) avaliaram a expressão de diferentes proteínas em isolados patogênicos e não-patogênicos de *Acanthamoeba*. A presença de diversas proteínas apenas nos isolados clínicos pode indicar o envolvimento dessas no processo patológico e na resistência às drogas empregadas no tratamento.

2.7.1 Metabolômica

O conjunto de moléculas de baixo peso molecular (até aproximadamente 1400 Da) presentes em determinado organismo – os metabólitos – é chamado metaboloma (VINCENT; BARRETT, 2015). Tais moléculas formam-se e transformam-se quimicamente durante o metabolismo celular e atuam como intermediárias nas reações metabólicas, além de constituírem também seus produtos. Além disso, são indispensáveis para a manutenção, crescimento e funcionamento das células (KRASTANOV, 2010).

Fiehn (2002) introduziu o termo metabolômica, que se refere a uma área da genômica funcional que analisa de forma abrangente o conjunto de metabólitos de uma célula, tecido, órgão ou organismo em determinado momento (KRASTANOV, 2010; PAGET *et al.*, 2013; SCHELTEMA *et al.*, 2010). Diferentemente dos genes e proteínas, cujas funções estão sujeitas à regulação epigenética e modificações pós-translacionais, respectivamente, os metabólitos são assinaturas diretas da atividade bioquímica, sendo a representação mais próxima do fenótipo (FIEHN, 2002).

Dois métodos complementares são utilizados na abordagem metabolômica: *targeted* e *untargeted*. O primeiro consiste na quantificação de metabólitos-alvo, com o objetivo de responder hipóteses específicas de uma via metabólica particular (KRASTANOV, 2010). A análise *untargeted*, por sua vez, baseia-se no perfil metabólico total de um organismo e tem por objetivo medir, simultaneamente, a maior quantidade possível de metabólitos nas amostras biológicas (KRASTANOV, 2010).

A existência de uma variedade significativa de metabólitos (polares, apolares, voláteis, entre outros) no extrato celular, com concentração estimada na faixa de pmol

a mmol, leva a necessidade da utilização de metodologias específicas na sua identificação e quantificação. Tais metodologias devem ser capazes de analisar simultaneamente uma grande quantidade de metabólitos com alta sensibilidade e seletividade (DUNN; ELLIS, 2005; ROCHFORT, 2005). A ampla diversidade de metabólitos com propriedades químicas e físicas distintas impede que a análise de todo o metaboloma seja realizada utilizando apenas um método (SCHELTEMA *et al.*, 2010). Dessa forma, com frequência utiliza-se uma combinação de métodos de extração e plataformas analíticas, dependendo do objetivo do estudo. Dentre as plataformas analíticas mais empregadas em estudos metabolômicos estão incluídas a ressonância nuclear magnética (NMR), a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e a eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS) (PAGET *et al.*, 2013).

Em metabolômica, o GC-MS é considerado o método padrão ouro na identificação de compostos como lipídios e outras biomoléculas. Esta tecnologia associa o baixo custo com alta sensibilidade e reprodutibilidade, além da existência de várias bases de dados públicas para a identificação dos compostos (PAGET *et al.*, 2013). Entretanto, apresenta a desvantagem de que apenas compostos voláteis e termoestáveis, ou que possam ser volatilizáveis por um processo de derivatização, podem ser analisados por essa técnica (CREEK *et al.*, 2012).

Uma das etapas essenciais na análise metabolômica é a preparação da amostra. Para a metabolômica de células e microrganismos, é necessária a utilização de um processo rápido, que interrompa instantaneamente as reações bioquímicas, chamado *quenching*. Caso a matriz utilizada não tenha seu metabolismo interrompido rapidamente, podem ocorrer alterações metabólicas subsequentes causadas pelo manuseio da amostra (VINCENT; BARRETT, 2015). A extração eficiente dos metabólitos do meio intracelular também é de extrema importância, devendo-se evitar ao máximo as perdas por degradação ou reações bioquímicas. A extração é feita, em geral, pela adição de um solvente como metanol ou acetonitrila em água para a extração de metabólitos polares (T'KINDT *et al.*, 2010). Geralmente, o protocolo para um experimento de metabolômica envolve o desenvolvimento de métodos analíticos, preparo de amostras, análise dos metabólitos, processamento e interpretação dos dados.

O potencial de estudos metabolômicos na parasitologia é particularmente relevante na elucidação de diversos aspectos da biologia dos parasitos e da sua interação com o hospedeiro, tendo se mostrado uma importante ferramenta na identificação de alvos terapêuticos e biomarcadores de doenças, além da identificação do mecanismo de ação das drogas (NEVEDOMSKAYA; MAYBORODA; DEELDER, 2011; PAGET *et al.*, 2013). Desse modo, a metabolômica pode fornecer informações úteis, auxiliando no entendimento da complexidade molecular dos organismos e doenças por eles causadas. Além disso, a análise metabolômica pode auxiliar na compreensão do processo de encistamento de *Acanthamoeba*, fornecendo informações adicionais àquelas já elucidadas por análises proteômicas. Dada a importância da formação de cistos na gravidade e progressão das doenças causadas por *Acanthamoeba*, é de extrema relevância o entendimento da sua formação, o que pode ser determinante na busca de possíveis alvos terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar qualitativamente e quantitativamente o perfil metabólico de *Acanthamoeba castellanii* e suas possíveis alterações durante o processo de encistamento.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a cinética do processo de encistamento de *Acanthamoeba castellanii*, caracterizando a proporção de trofozoítos, pré-cistos e cistos nos tempos determinados.
- Realizar a extração de metabólitos de trofozoítos e de formas em diferentes fases do processo de encistamento.
- Analisar comparativamente os metabólitos presentes nas diferentes formas de *Acanthamoeba* por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (GC-MS).
- Propor possíveis vias metabólicas envolvidas no processo de encistamento de *Acanthamoeba*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de protozoários

Nos experimentos realizados, foi utilizada a cepa de referência ATCC 30010 de *Acanthamoeba castellanii*. A amostra da cultura foi gentilmente cedida pelo Professor Dr. Jônatas Santos Abrahão, do Laboratório de Vírus do ICB – UFMG. A referida cepa foi isolada do solo em 1957 por Neff. As amebas dessa espécie apresentam características morfológicas do grupo II, possuindo cistos de 11 a 18 µm, endocisto que pode apresentar-se de forma estrelada, oval, triangular ou quadrangular, e ectocisto que acompanha o contorno do endocisto. A classificação molecular por sequenciamento do gene 18S rDNA mostrou se tratar do genótipo T4 (KHAN, 2006).

O isolado foi mantido em sua forma evolutiva de cisto à temperatura ambiente em salina de Neff (KOEHLER *et al.*, 2009) e também na forma de trofozoítos, em meio de cultivo PYG [proteose-peptona, 20g/L; extrato de levedura, 1g/L; glicose 0,1M; 0,4mM CaCl₂; 4mM MgSO₄.7H₂O; citrato de sódio 3,4mM; 0,05mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 2,5mM Na₂HPO₄.7H₂O; 2,5mM KH₂HPO₄] (ALFIERI *et al.*, 2000) e 10% de soro fetal bovino (SFB), conforme procedimentos descritos por Duarte *et al.* (2013), em tubos de ensaio fechados em posição inclinada em temperatura de 32°C. Para evitar a contaminação com outros microrganismos, acrescentou-se o antibiótico Enrofloxacino 0,02mg/mL. Os repiques de manutenção foram realizados mensalmente para novos tubos.

4.2 Cinética de encistamento

A fim de se determinar o tempo levado para a formação de cistos, foi realizada a cinética do processo de encistamento. Um inóculo inicial em garrafas de cultivo de 75cm² foi realizado, a fim de obter um grande volume de trofozoítos. Após 72 horas de crescimento a 32°C em meio PYG, os trofozoítos foram submetidos a três lavagens consecutivas em salina de Neff por centrifugação a 400xg e temperatura ambiente.

Às garrafas de 25cm² foram acrescentados 10mL de salina de Neff contendo um total de 1,0x10⁷ trofozoítos, a fim de induzir o encistamento dos trofozoítos, proporcionado pela solução salina pobre em nutrientes. A contagem diferencial de trofozoítos, pré-cistos e cistos foi realizada de diariamente, nos tempos 0h, 24h, 48h e 72 horas. A fim de validar estatisticamente as contagens, para cada tempo seis amostras de cada garrafa foram contadas.

4.3 Análise metabolômica de *Acanthamoeba castellanii*

Após avaliação das taxas de encistamento, três tempos foram escolhidos para a realização de extração e análise metabolômica: 0h (contendo apenas trofozoítos), 24h (tempo intermediário) e 72h (contendo majoritariamente cistos).

4.3.1 *Quenching* metabólico

A interrupção do metabolismo celular - *quenching* metabólico - foi realizada através de diminuição rápida da temperatura do meio das garrafas. Este procedimento foi feito pela imersão das garrafas de cultivo em banho de etanol/gelo seco por aproximadamente 20 segundos, evitando-se o congelamento do meio de encistamento, o que pode causar extravasamento do conteúdo intracelular. O procedimento de *quenching* evita que as alterações encontradas estejam associadas com o manuseio das amostras e/ou ao método de extração (VINCENT; BARRETT, 2015). As formas foram então contadas em câmara de Neubauer e a extração foi realizada com volume contendo a quantidade equivalente a 1×10^7 células.

4.3.2 Extração e derivatização dos metabólitos

Para a extração, as células foram lavadas com PBS 1X por meio de centrifugação com centrífuga a 4°C, em velocidade de 400xg por 10 minutos. O *pellet* foi suspenso em 1,5mL de metanol pré-aquecido por 30 minutos a 56°C e o tubo mantido nessa temperatura por 15 minutos em banho seco. Em seguida, foram adicionados 500µL de água Milli-Q à mistura, que foi então submetida a três ciclos de sonicação de 20 segundos e frequência de 75Hz, com 20 segundos de intervalo entre cada ciclo. Às amostras foram acrescentados então 500µL de clorofórmio, que então foram submetidas a três ciclos de *freeze and thaw* (congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em água a 37°C). O lisado foi centrifugado por 10 minutos a 16.000xg e 4°C e em seguida distribuiu-se 200µL do sobrenadante para cada inserto contido em *vials* de vidro. Adicionalmente, foi produzido um branco, do mesmo modo que as demais amostras, para assegurar a qualidade da análise em relação a possíveis contaminações nas etapas de extração e derivatização. Os tubos de vidro foram, então, secos completamente em *SpeedVac* a 30°C por aproximadamente 2 horas.

A reação de metoximação, geralmente necessária para a diminuição da polaridade dos grupos funcionais e melhor separação pelo GC (HALKET *et al.*, 2005), foi realizada através da adição de 10µL de metoxiamina (15ppm,15mg/mL) em piridina. Os tubos foram hermeticamente encapsulados e submetidos a três ciclos de agitação em vórtex por dois minutos. Em seguida, os *vials* foram incubados *overnight* à temperatura ambiente em local protegido da luz.

Para a reação de sililação, também responsável pela diminuição da polaridade da molécula através da substituição de um hidrogênio por um grupo R₃Si (ORATA, 2012), 10µL de BSFTA+TMS (99:1) foram adicionados aos *vials* descapsulados. Em sequência, tubos foram recapsulados, agitados em vórtex por 5 minutos e incubados por 1 hora à 70°C. As amostras foram descapsuladas e 100µL de heptano contendo 10 ppm de padrão C18 (metil estearato) foram adicionados. 20µL de cada amostra foram coletados e homogeneizados para preparar os controles de qualidade ou *quality control* (QC), de modo que foram produzidos 1 QC para cada 5 amostras. Em seguida, as amostras foram armazenadas à -80°C até a sua injeção no GC-MS.

4.3.3 Parâmetros da injeção no GC-MS

As condições de injeção no GC-MS para metabolômica foram otimizadas em publicação prévia de Garcia e Barbas (2011). 2 µL da amostra derivatizada foram injetados por um auto-amostrador Agilent 7693 em modo *Split* no cromatógrafo gasoso (Agilent 7890A) acoplado a espectrômetro de massas com detector de eixo triplo (Agilent 5975C). A separação foi realizada utilizando uma pré-coluna J&W de 10m (Agilent Technologies®) integrada a uma coluna ultrainterte DB-5MS, com 30m de comprimento, 0.25mm de diâmetro interno e um filme de 25µm composto por 95% de dimetilpolisiloxano e 5% de difenil (Agilent Technologies®). A entrada do injetor foi mantida a 250°C, e gás hélio foi utilizado como fase móvel a um fluxo de 1.0 mL/minuto. A taxa de *Split* utilizada foi de 1:10. A temperatura inicial da coluna foi mantida à 60°C durante um minuto após a injeção, em seguida a temperatura foi aumentada gradativamente a uma taxa de 10°C/min até atingir a temperatura final de 325°C, e resfriada por 10 min após a análise. As temperaturas do injetor, linha de transferência, fonte do filamento e quadrupolo foram mantidas a 250°C, 280°C, 230°C e 150°C, respectivamente. O quadrupolo (5975 inert MSD, Agilent) foi controlado pelo software *Chemstation*. A fonte de ionização de elétrons foi operada a -70 eV. A

detecção pelo espectrômetro foi executada no modo de varredura no intervalo de 50-600 m/z a uma taxa de 2.7 varreduras/segundo.

4.3.4 Processamento dos dados

Para o tratamento, os dados produzidos no GC-MS foram previamente convertidos para o formato *.CDF no programa ChemStation E.02.02.1431. O processamento dos dados foi feito software XCMS (versão 1.24.1) executado no programa R (versão 3.2.3). A extração de dados foi feita pelo método de “*matched filter*”. Os seguintes parâmetros foram utilizados para detecção dos picos: largura de pico (fwhm) = 6, relação sinal/ruído (snthresh) = 2, número máximo de picos por cromatograma de íon extraído (max) = 100. Os picos foram agrupados por meio da correção da largura de banda (bw) = 6 e 3 e largura das faixas sobrepostas de m/z's (mzwid) = 0.25. Para identificação de compostos co-eluidos com base no índice de retenção, o software AMDIS (versão 2.71) foi empregado. A ferramenta ‘*fillPeaks*’ foi utilizada para remoção de *missing values*. A correção dos tempos de retenção foi feita no XCMS, para isso o método *default* de “retcor” foi aplicado, com alinhamento não linear e grau de suavização de ajuste da regressão polinomial (span) = 0.5. Os dados foram normalizados pela intensidade do fragmento mais intenso do padrão interno, C18 metil estearato (m/z em 19.61 min), seguido por aplicação de log na base 2.

4.3.5 Análises estatísticas

Para realização das análises multivariadas, os dados foram escalonados pelo método de pareto. Esta metodologia apresenta a vantagem de que o resultado final se aproxima da medida original (WORLEY; POWERS, 2013). Os *score plots* de PCA e PLS-DA, bem como o teste permutações foram realizados no SIMCA 14.1. Os dados foram avaliados quanto à sua normalidade pelos testes de Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk e Lifefors. O teste t de Student foi aplicado aos dados considerados normais, enquanto o teste U de Mann-Whitney foi aplicado aos dados não paramétricos. Todas as análises univariadas foram realizadas no software Statistica versão 10. O *heatmap* foi construído no software live online Metaboanalyst versão 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>). O enriquecimento de vias foi realizado no MBROLE, utilizado dados depositados no KEGG para os organismos *Naegleria gruberi*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Entamoeba histolytica*.

5 RESULTADOS

5.1 Cinética de encistamento de *Acanthamoeba castellanii* em salina de Neff

A quantidade de trofozoítos, pré-cistos e cistos de *Acanthamoeba castellanii*, obtida por contagens realizadas a cada 24 horas em câmara de Neubauer estão representadas, em porcentagem, na **Figura 9**. Observa-se que no momento inicial, tempo de 0 horas, as contagens apresentavam 100% de trofozoítos, caracterizados pela presença de acantopódios e vacúolos digestivos em seu interior. Após o meio de cultivo ser substituído por salina de encistamento (Salina de Neff), os trofozoítos iniciam sua transformação em cistos, observando-se já no tempo de 24 horas 17,9% de pré-cistos, caracterizados pela ausência de acantopódios e início da produção da parede cística. Nesse tempo, os cistos representam 54% das células. Já com 48 horas, os pré-cistos representam 9,6%, enquanto os cistos representam 75,3%. Com a progressão do encistamento, diminui a quantidade de trofozoítos. No tempo de 72 horas, os pré-cistos representam 4,1% e os cistos representam 85,6% das células, havendo uma pequena quantidade de trofozoítos típicos.

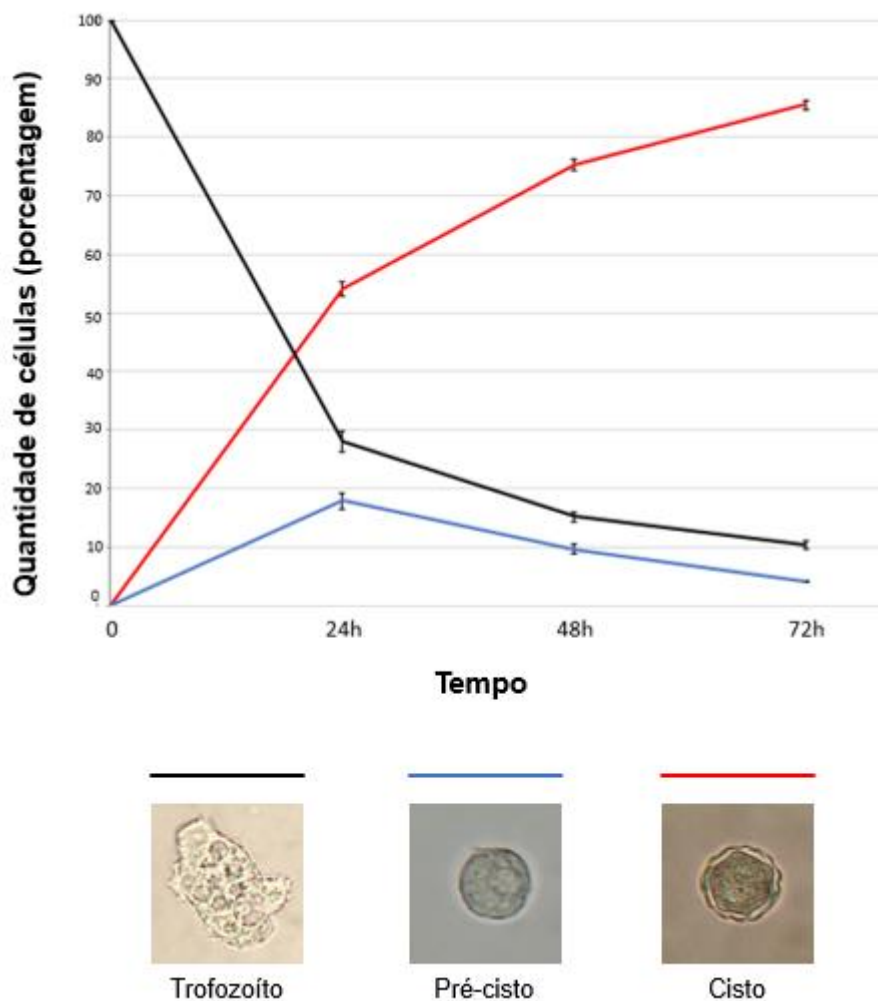


FIGURA 9. Cinética de encistamento de *Acanthamoeba castellanii* em salina de Neff. Inicialmente 100% das células apresentam-se sob a forma de trofozoítos. No tempo de 24 horas, observa-se que 54% das células já se encontram na forma de cistos. Ao fim do experimento, 85,6% das células observadas são cistos.

5.2 Análise metabolômica do encistamento de *Acanthamoeba castellanii*

5.2.1 O método analítico apresentou reprodutibilidade e permitiu identificar 22 metabólitos

A fim de avaliar a qualidade dos procedimentos analíticos, foi empregada a Análise de Componentes Principais (PCA), um método de estatística multivariada não supervisionado, que visa reduzir a dimensionalidade dos dados, extraindo

informações relevantes dos dados e expressando-os por meio de índices compactos, chamados componentes principais (CADIMA; JOLLIFFE, 2016). Trata-se de um método de análise multivariada amplamente utilizado em metabolômica do tipo “*fingerprinting*” e em quimiometria como um todo (WORLEY; POWERS, 2013).

A partir da análise do gráfico apresentado na **Figura 10** observa-se que, apesar de um dos QCs se encontrar ligeiramente afastado do agrupamento (a avaliação por distribuição T^2 de *Hotteling* mostrou não se tratar de um *outlier*), em geral o agrupamento foi satisfatório, demonstrando a estabilidade e reprodutibilidade da técnica empregada nas análises metabolômicas. Além disso, observa-se uma tendência de agrupamento das amostras de acordo com o tempo de cultivo em salina de encistamento, o que configura um fato relevante, uma vez que se trata de um método não-supervisionado.

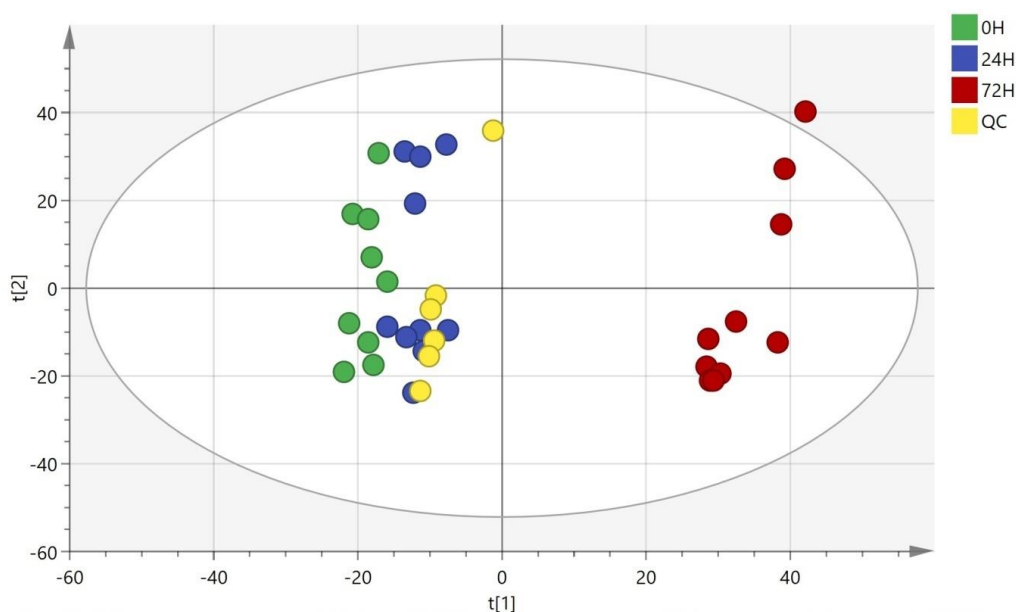


FIGURA 10. Análise de componentes principais construído com os *features* totais obtidos pelo GC-MS na presença dos QCs (pontos amarelos), em amostras de *Acanthamoeba castellanii* em processo de encistamento em salina de Neff. Os demais pontos coloridos representam as amostras em processo de encistamento nos tempos zero (verde), 24h (azul) e vermelho (72 horas). Previamente à construção do *score plot*, os *features* foram escalonados em pareto. Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0.676$ e $Q^2 = 0.578$.

A metodologia empregada permitiu a detecção de 1205 *features*, a partir dos quais 22 metabólitos foram identificados. Na tabela em anexo (**Anexo A**) estão listados todos os metabólitos identificados e suas características específicas, como fórmula molecular, categoria bioquímica e massa isotópica. A categoria de aminoácidos, peptídeos e conjugados representou 45,45% do total dos metabólitos identificados (**Figura 11**). A segunda categoria mais abundante foi a dos carboidratos, representando 27,27%. Já os ácidos orgânicos e derivados e os lipídios e esteróis representam, cada, 9,1% do total, enquanto os compostos aromáticos e os compostos nitrogenados e poliaminas representam 4,54%.

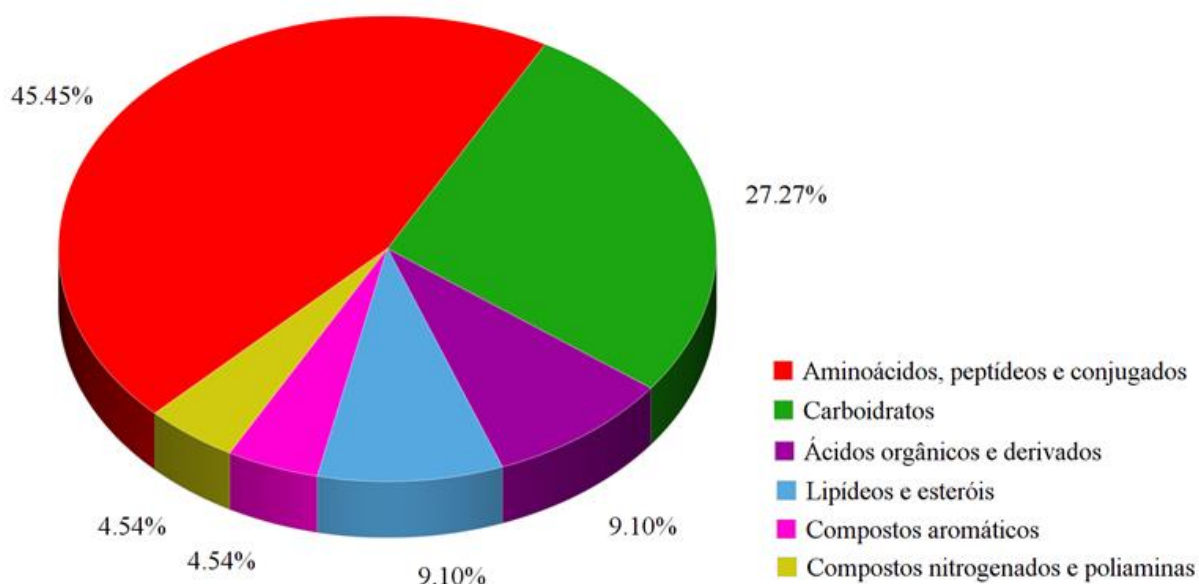


FIGURA 11. Classificação bioquímica dos compostos identificados por GC-MS em amostras de *Acanthamoeba castellanii* em processo de encistamento em salina de Neff. As categorias bioquímicas incluem todos os tempos avaliados e foram definidas com base em informações disponíveis sobre cada metabólito no KEGG, HMDB, Pubchem, YMDB e ChEBI.

5.2.2 A análise metabolômica diferencia os estágios de trofozoítos e cistos

Após a verificação da qualidade do método analítico, foi realizada a análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Esse teste apresenta natureza supervisionada e permite separar os grupos com maior definição,

como pode ser visto na **Figura 12a**. Observa-se, neste caso, o forte agrupamento das amostras de acordo com o tempo de cultivo em salina de Neff. Os parâmetros de qualidade da análise, R^2 e Q^2 , cujos valores foram 0.896 e 0.785, respectivamente, demonstraram que o modelo é adequado para explicar a variação e que ele apresenta alta capacidade de predição estatística, confirmando a significância da performance do modelo.

No entanto, os valores de R^2 e Q^2 podem ser obtidos ao acaso devido à escolha aleatória de amostras do conjunto, de forma que não é claro qual valor desses testes de fato relaciona-se a uma boa discriminação entre os grupos (WESTERHUIS *et al.*, 2008). A fim de fornecer uma medida da significância estatística do teste (valor p), realizou-se um teste de permutação, no qual assume-se que não há diferença entre dois grupos aleatoriamente formados. Dessa forma, as identificações das amostras são aleatoriamente permutadas e um novo modelo de classificação é calculado. Desse modo, a **Figura 12b**, valida o modelo de PLS-DA, confirmando que a alta capacidade discriminatória do modelo, não resulta do favorecimento aleatório de determinada amostra do conjunto.

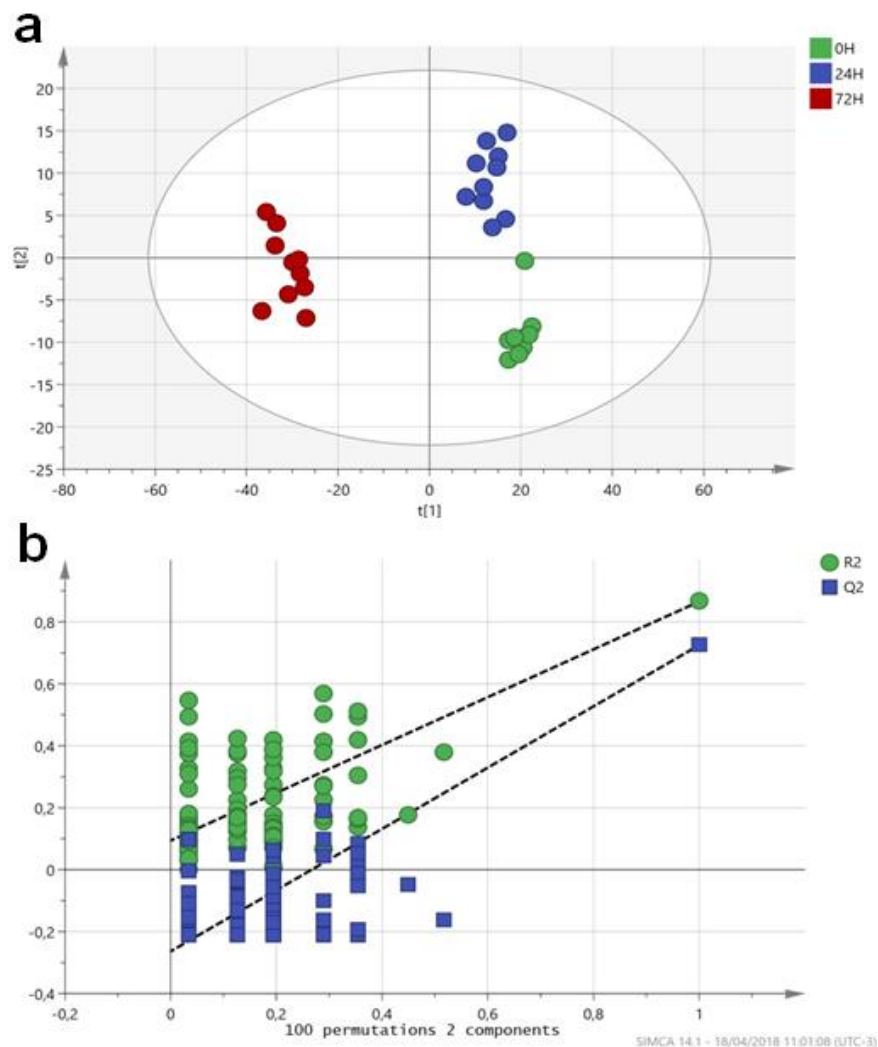


FIGURA 12. PLS-DA diferencia os estágios de cisto e trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* em processo de encistamento em salina de Neff. (a) O modelo de PLS-DA foi construído com os *features* totais normalizados pela intensidade do padrão interno C18, transformados em log na base 2 e escalonados em pareto. Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2= 0.896$ e $Q^2 = 0.785$; ANOVA: p -valor = $4.17e^{-10}$. **(b)** Validação do PLS-DA por teste de permutação (100 permutações aplicadas).

Além disso, foi construído um *heatmap* para identificar as diferenças na abundância dos compostos no perfil metabólico nos tempos de 0 h, 24 h e 72 h (**Figura 13**). A análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) revelou níveis distintos de abundância de diversos metabólitos entre os tempos analisados e, especialmente, entre os estágios de desenvolvimento avaliados. A análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) com base na intensidade dos metabólitos (dendograma vertical) revelou alguns grupos de metabólitos que diferem em abundância entre os diferentes tempos avaliados.

Já a árvore demonstrada horizontalmente indica que o perfil metabólico da forma de cisto e de trofozoíto diferem claramente, sendo observada uma maior abundância de diversos metabólitos na fase de trofozoíto. Na análise hierárquica representada no *heatmap* horizontalmente observa-se ainda que os perfis metabólicos de 0h e 24h são próximos, agrupando-se em um mesmo clado, diferindo consideravelmente do perfil observado para 72 horas, cuja abundância de metabólitos é nitidamente menor. Por outro lado, dentre os metabólitos identificados, observa-se o aumento da abundância de arbutina, celobiose e lactose no tempo de 72h em relação aos tempos anteriores. Desta forma, padrões bem distintos foram detectados pela análise metabolômica por GC-MS entre as amostras estudadas. Esses dados ratificam os resultados observados no PLS-DA.

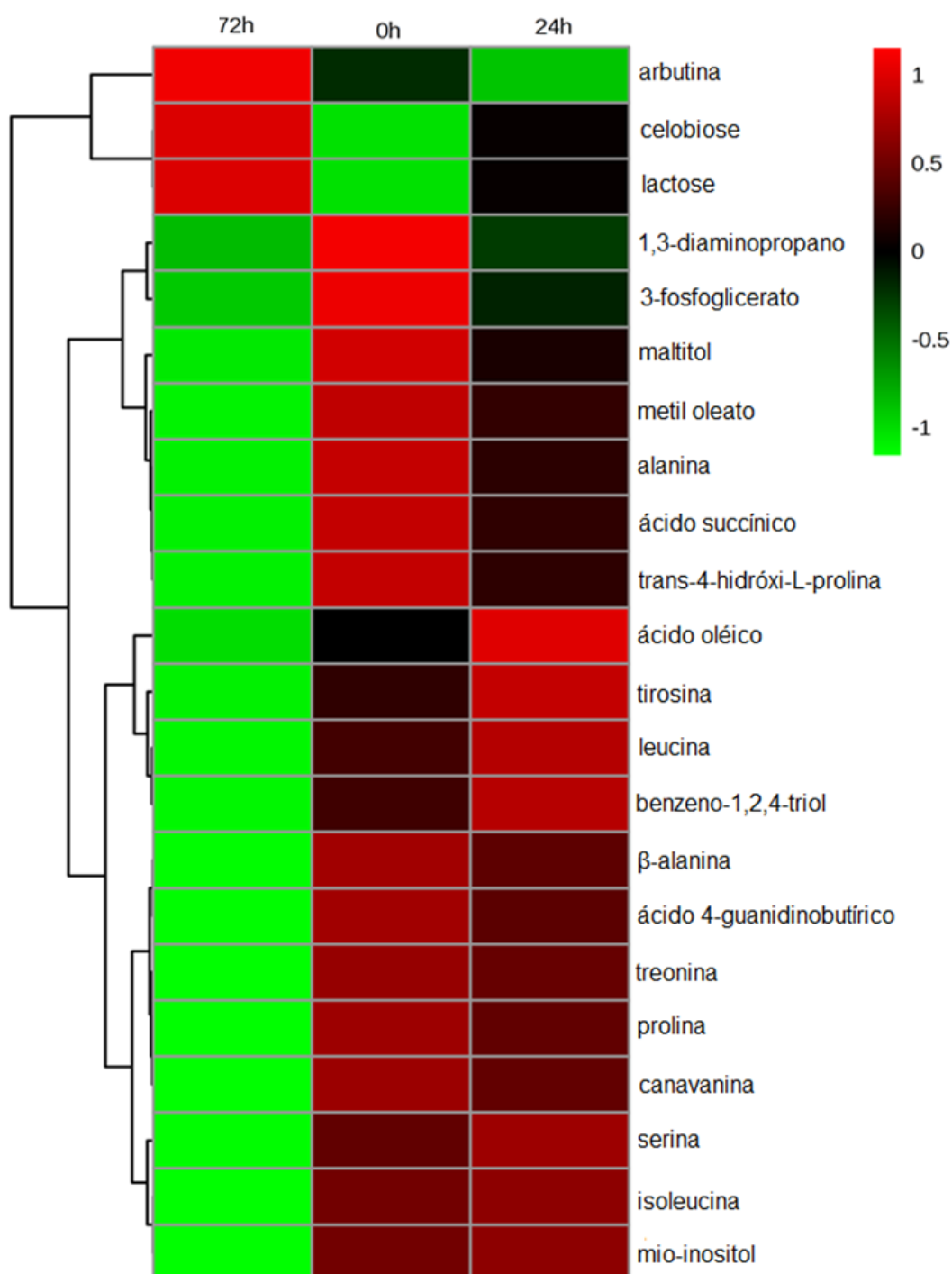


FIGURA 13. Avaliação do perfil metabólico das diferentes formas evolutivas de *Acanthamoeba castellanii* por *Heatmap*. A abundância de cada metabólito é representada pela escala de cor, variando de -1 (verde) a 1 (vermelho). Para permitir a comparação dos dados, a abundância iônica média foi transformada por $\text{Log}_2 n$. No eixo x estão apresentadas os tempos avaliados durante o processo de encistamento e no eixo y estão indicados os metabólitos identificados. Os seguintes parâmetros foram utilizados na construção dos dendogramas: distância euclidiana; método de agrupamento de ligação completa. O *software* MetaboAnalyst foi utilizado na construção da figura.

5.2.3 As diferenças no perfil metabólico foram significativas na comparação entre dois tempos

Modelos de PLS-DA comparando os tempos de cultivo em salina de encistamento entre dois tempos distintos foram construídos com o intuito de possibilitar a identificação de diferenças significativas entre as formas e podem ser visualizados na **Figura 14**. A fim de avaliar a confiabilidade dos dados gerados, empregou-se o teste de Análise Multivariada de Variância (MANOVA), que compara as médias amostrais multivariadas, sendo utilizado quando há duas ou mais variáveis dependentes. Para as três comparações feitas, nos tempos de 0h x 24h, 0h x 72h e 24h e 72h, encontrou-se valor $p < 0,05$, ou seja, as diferenças entre as médias avaliadas são estatisticamente significativas.

É possível observar, nos gráficos, uma nítida separação entre todos os grupos referentes aos estágios de desenvolvimento avaliados, o que evidencia a diferença do perfil metabólico entre os mesmos. Neste caso, os valores de R^2 e Q^2 foram, respectivamente, de 0.973 e 0.813 na comparação de 0 e 24h; 0.993 e 0.988 na comparação de 0 e 72h; e 0.994 e 0.976 na comparação 0 e 72h, demonstrando a alta qualidade dos modelos gerados.

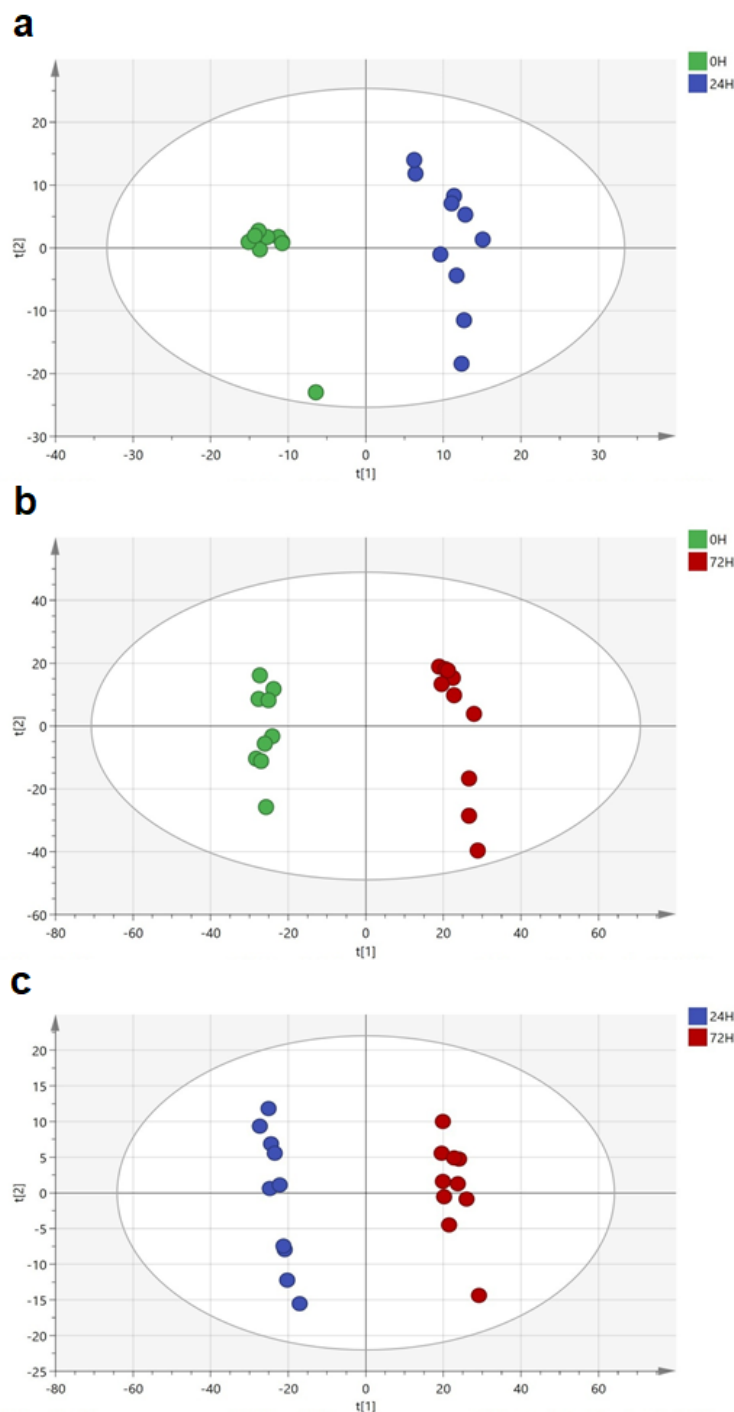


FIGURA 14. PLS-DA diferencia o perfil metabólico de *Acanthamoeba castellanii* em processo de encistamento em salina de Neff nos tempos de cultivo avaliados. O modelo de PLS-DA foi construído com os *features* totais normalizados pela intensidade do padrão interno C18, transformados em log na base 2 e escalonados em pareto. **(a) Diferenças observadas entre os tempos de 0 horas e 24 horas. Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0.973$ e $Q^2 = 0.813$; ANOVA: $p\text{-valor} = 1.06e^{-4}$ **(b)** Diferenças observadas entre os tempos de 0 horas e 72 horas. Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0.993$ e $Q^2 = 0.988$; ANOVA: $p\text{-valor} = 3.35e^{-12}$. **(c)** Diferenças observadas entre os tempos de 24 horas e 72 horas. Parâmetros de qualidade do modelo: $R^2 = 0.994$ e $Q^2 = 0.976$; ANOVA: $p\text{-valor} = 9.56e^{-13}$.**

A contribuição das variáveis para a construção do modelo foi obtida pelo valor de VIP (*variable importance in projection*), considerando o valor $VIP > 1,0$ significativo. Os metabólitos considerados significativos pela análise multivariada estão apresentados na **Tabela 2**.

Adicionalmente, os dados foram avaliados quanto à normalidade pelos testes Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors e Shapiro-Wilk, apresentando menos de 15, 30 e 35% dos dados com distribuição não-normal, respectivamente. Em metabolômica, os dados geralmente não se enquadram perfeitamente no conceito de distribuição normal (KOEK et al., 2011). Desse modo, foi aplicado o teste U de Mann-Whitney (teste não paramétrico) aos dados, juntamente com o teste T de Student (teste paramétrico), com valor $p < 0,05$. Os metabólitos significativos por estatística univariada também estão apresentados na **Tabela 2**, assim como os valores de *fold change*, valores da razão entre as médias dos grupos de maior e menor tempo, calculado para cada metabólito estatisticamente significativo.

Tabela 2. Metabólitos que diferem significativamente os estágios de trofozoíta e cisto

Metabólito	0h x 24h				0h x 72h				24h x 72h			
	VIP	Mann-Whitney	Teste t	Fold Change	VIP	Mann-Whitney	Teste t	Fold Change	VIP	Mann-Whitney	Teste T	Fold Change
Leucina					1.03	3.73E-03	9.87E-03	0.62	1.4	2.86E-03	2.51E-03	0.55
Proline					2.21	2.24E-04	4.34E-07	0.19	2.16	3.09E-04	6.10E-06	0.21
Isoleucina					1.22	2.79E-04	1.51E-04	0.71	1.53	5.20E-04	2.57E-04	0.69
Serina					1.03	1.67E-03	2.05E-03	0.79	1.24	2.20E-03	1.22E-03	0.76
Treonina					1.18	2.80E-04	1.18E-05	0.79	1.14	2.20E-03	3.21E-04	0.81
Ácido succínico	2.64	2.79E-04	1.47E-06	0.77	2.22	2.73E-04	1.38E-06	0.29	1.92	2.73E-04	3.20E-05	0.37
B-alanina					1.98	3.31E-04	1.20E-04	-∞	1.94	4.13E-04	3.25E-04	-∞
Trans-4-hidróxi-L-prolina	1.62			0.84	1.86	3.69E-03	2.04E-03	0.50	1.4	3.02E-02	4.18E-02	0.59
Ácido 4-guanidinobutírico					1.83	1.01E-02	3.71E-03	0.33		7.42E-03	8.51E-03	0.37
1,3-diaminopropano	1.05			0.83								
3-fosfoglicerato						1.60E-02	1.92E-02	0.80				
Tirosina									1.06	3.04E-02	3.15E-02	0.76
Canavanina	1.02	3.75E-03	4.56E-03	0.95	1.61	2.80E-04	4.16E-08	0.60	1.63	2.80E-04	1.22E-07	0.63
Mio-inositol					1.31	2.80E-04	8.58E-09	0.76	1.47	2.80E-04	1.19E-09	0.75
Metil oleato	1.67	2.79E-04	9.11E-07	0.83	1.4	2.73E-04	1.42E-04	0.41	1.22	3.74E-04	1.57E-03	0.50
Arbutina						2.20E-03	2.96E-02	1.15	1.14	1.67E-03	7.52E-03	1.25
Celobiose							2.74E-02	1.03				
Lactose							2.74E-02	1.03				

Para cada comparação feita entre os tempos de cultivo, realizou-se testes não paramétricos (Mann-Whitney U test) e paramétrico (teste t). Além disso, o valor de *fold change* foi calculado pela razão entre a média do grupo de tempo maior e menor. Para *fold change* igual a -∞, entende-se que determinado metabólito não foi detectado no tempo de 72h.

5.2.4 O enriquecimento indicou vias metabólicas de biossíntese, metabolismo e de transportadores ABC

Até o alcance do nosso conhecimento, este é um dos trabalhos pioneiros de abordagem metabolômica para o estudo de *Acanthamoeba castellanii*. Dessa forma, poucos aspectos metabólicos desse organismo já foram caracterizados, havendo poucas informações disponíveis no KEGG (*Kyoto encyclopedia of genes and genomes*), um banco de dados com a finalidade de se compreender funções complexas dos sistemas biológicos, como microrganismos, a partir de informações de nível molecular, como dados moleculares de larga escala gerados pelo sequenciamento de genomas e outras tecnologias experimentais.

Desse modo, para avaliar as vias metabólicas envolvidas no processo de encistamento de *Acanthamoeba*, os metabólitos significativos por análise estatística multivariada ou univariada foram utilizados para o enriquecimento de vias utilizando o programa MBRole 2.0, com informações disponíveis no KEGG para as amebas *Naegleria gruberi* (ameba de vida livre do gênero *Naegleria*, que também possui espécies patogênicas) e *Entamoeba histolytica* (ameba patogênica formadora de cisto), além da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

As vias enriquecidas listadas na **Tabela 3** apresentam valor de $p < 0,05$. No entanto, apenas para os tempos de 0hx72h e 24hx72h foi possível o enriquecimento de vias, tendo em vista que no caso da comparação de 0hx24h apenas quatro metabólitos foram estatisticamente significativos, não sendo possível, com esses metabólitos, enriquecer nenhuma via.

Utilizando *Naegleria gruberi* e *Saccharomyces cerevisiae* como referência para buscas nos bancos de dados, no tempo de 24hx72h a via de transportadores ABC também se mostrou diferencialmente regulada para este microrganismo. Essa via, apesar de não ter sido relacionada aos microrganismos buscados no tempo de 0hx72h, foi encontrada no banco de dados completo.

Por outro lado, utilizando *Entamoeba histolytica* como referência, a via de biossíntese de valina, leucina e isoleucina e a via do metabolismo de glicina, serina e treonina mostraram-se diferencialmente reguladas no tempo de 0hx72h.

Por fim, ao usar como parâmetro de busca *Saccharomyces cerevisiae*, observou-se que a via da biossíntese de valina, leucina e isoleucina, assim como a via do metabolismo de glicina, serina e treonina encontram-se diferencialmente

reguladas no tempo de 0hx72h. Já para o tempo de 24hx72h, tal diferença é observada para a via dos transportadores ABC.

Tabela 3. Vias metabólicas de *Acanthamoeba castellanii* em processo de encistamento enriquecidas utilizando o programa MBRole 2.0

0h x 72h			24h x 72h		
Via metabólica	Metabólito presente na via enriquecida	Organismo modelo utilizado no enriquecimento	Via metabólica	Metabólito presente na via enriquecida	Organismo modelo utilizado no enriquecimento
Biossíntese de valina, leucina e isoleucina	Treonina, isoleucina, leucina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Entamoeba histolytica</i>	Biossíntese de valina, leucina e isoleucina	Treonina, isoleucina, leucina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Metabolismo de glicina, serina e treonina	Treonina, serina, 3-fosfoglicerato	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Entamoeba histolytica</i>	Transportadores ABC	Leucina, prolina, isoleucina, serina, treonina, mio-inositol, celobiose, lactose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Naegleria gruberi</i>
Transportadores ABC	Leucina, prolina, isoleucina, serina, treonina, mio-inositol, celobiose, lactose	Banco de dados completo			

*A tabela lista apenas vias cujo valor p e a taxa de falsa descoberta foram <0,05.

6 DISCUSSÃO

A capacidade de *Acanthamoeba* variar sua morfologia, se transformando em cistos resistentes a condições adversas, está diretamente relacionada ao desenvolvimento das infecções e em sua persistência. A alta resistência dos cistos pode impedir sua eliminação completa dos tecidos, sendo que a permanência de poucas dessas formas é capaz de induzir a recrudescência da infecção (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015a). Apesar da relevância do encistamento no contexto das infecções por *Acanthamoeba*, são ainda consideradas limitadas as informações sobre os mecanismos moleculares do processo neste organismo e em outros protistas (SCHAAP; SCHILDE, 2018). Sobre *Acanthamoeba*, os dados existentes abrangem fatores biológicos indutores de encistamento, como inanição, alta osmolaridade, sais de magnésio (AQEEL *et al.*, 2013), o reconhecimento da composição celulósica da parede cística e alguns componentes enzimáticos envolvidos, como a glicogênio fosforilase (MOON *et al.*, 2014), além do relato de proteínas de autofagia (KIM *et al.*, 2015) e de proteases importantes no processo (MOON *et al.*, 2012).

Inicialmente, com a proposta de avaliar os metabólitos envolvidos no encistamento de *Acanthamoeba*, foi realizada a cinética de encistamento de *Acanthamoeba* em salina de Neff, capaz de induzir o processo pela falta de nutrientes e hiposmolaridade (DE MORAES; ALFIERI, 2008). Com isso, foi possível a determinação das formas predominantes em cada tempo avaliado. Observou-se, nas contagens realizadas, que durante as primeiras 24 horas de cultivo em salina de Neff, ocorre a diferenciação dos trofozoítos em pré-cistos, com alterações morfológicas como a perda de acantopódios e arredondamento das células. No tempo de 72 horas, por outro lado, observou-se maior quantidade de cistos, caracterizados pela presença de parede dupla e ausência de vacúolos digestivos (CHAVEZ-MUNGUÍA *et al.*, 2005).

Os cistos de *Acanthamoeba* são amplamente resistentes a processos físicos e químicos, devido à sua dupla parede (LLOYD, 2014). A parede do cisto se mantém intacta mesmo após o tratamento com SDS, EDTA e enzimas, incluindo a papaína, DNase, RNase e proteinase K (DUDLEY; JARROLL; KHAN, 2009), além de suportar condições físicas extremas, como calor e ciclos de *freeze and thaw* (AKSOZEK *et al.*, 2009). Os cistos também são resistentes à maioria das soluções desinfetantes para

lentes de contato, exceto aquelas contendo peróxido de hidrogênio 3%, que representam a minoria das soluções disponíveis no mercado (JOHNSTON *et al.*, 2009). Dessa forma, foi necessária a combinação de métodos físicos e químicos para o efetivo rompimento da parede cística e extração dos metabólitos de *Acanthamoeba* neste estudo. O processo de incubação dos cistos em metanol pré-aquecido à 56°C seguida de ciclos de sonicação e *freeze and thaw* mostrou-se eficiente, não se observando mais a presença de células intactas. Esses métodos físicos são comumente utilizados no rompimento de membranas celulares em estudos metabolômicos (MATHEUS *et al.*, 2014; PINU; VILLAS-BOAS; AGGIO, 2017).

Após o processamento das amostras no GC/MS, cerca de 22 metabólitos foram identificados, sendo que dezoito exibiram alterações significativas na concentração entre os tempos avaliados, levando em consideração testes de estatística multivariados ou univariados (paramétricos ou não-paramétricos). Cada metabólito foi avaliado individualmente, no que diz respeito à sua potencial função metabólica no processo de encistamento. Por meio do enriquecimento de vias, buscou-se relacionar os metabólitos identificados com vias metabólicas já descritas ao encistamento de *Acanthamoeba*.

Foi possível identificar, com suporte estatístico, diversos aminoácidos cuja concentração diminuiu durante o processo de encistamento. No encistamento de *Entamoeba invadens*, uma ameba comensal que habita o trato gastrointestinal de répteis herbívoros, toda a glicose celular é utilizada na síntese de quitina para a formação da parede celular. Os aminoácidos passam a ser a principal fonte de energia para as células, de forma que a concentração destes substratos diminui com o avanço do encistamento, assim como seu conteúdo energético (JEELANI *et al.*, 2012). De forma semelhante, a diminuição da concentração de todos os aminoácidos foi identificada presentemente para *A. castellanii*, o que pode indicar a sua utilização preferencialmente no metabolismo energético, enquanto os carboidratos estariam possivelmente envolvidos na estruturação da parede cística de celulose. Destaca-se que estudos prévios demonstraram que o catabolismo de aminoácidos como a metionina e a treonina podem ser eficientes formas de produção de ATP em condições anaeróbias (ANDERSON; LOFTUS, 2005).

Além disso, pode-se sugerir que a queda da concentração de aminoácidos durante o processo de encistamento esteja relacionada com a diminuição do metabolismo da ameba como um todo e, conseqüentemente, com a diminuição da síntese de proteínas (SIDDIQUI; DUDLEY; KHAN, 2012). Um estudo que avaliou o conteúdo proteico de *Acanthamoeba* observou que, durante o encistamento, 51 proteínas presentes no trofozoíto desapareceram, enquanto 16 novas proteínas foram sintetizadas. Atribuiu-se, assim, a ausência dessas proteínas no cisto ao seu uso como precursor na formação da parede cística ou como fonte de energia (PARK; JEONG; AHN, 2002).

A canavanina é um análogo estrutural da L-arginina que foi encontrado em maior abundância no tempo de 24 horas e em menor no tempo de 72 horas no presente estudo. Uma vez assimilada, a canavanina é usada na extensão de peptídeos no lugar do aminoácido funcional. Isso resulta em má formação das proteínas, o que justifica sua toxicidade em vários organismos (KAMO *et al.*, 2015). A canavanina compete e bloqueia a assimilação da arginina, diminuindo o crescimento exponencial a linear de *Escherichia coli* (SCHWARTZ; MAAS, 1960). A perda de viabilidade proteica causada pela assimilação da canavanina leva ainda a uma redução na produção de RNA e não ocorrem novos ciclos de replicação (ROSENTHAL, 1977). Além disso, outro estudo demonstrou que as cianobactérias *Anabaena doliolum*, formadoras de heterocistos como forma de resistência, tem seu crescimento e diferenciação inibida pela presença de canavanina (KUMAR; KUMAR, 1981). Foi demonstrada, ainda, a capacidade desse composto de inibir o crescimento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (PEREIRA *et al.*, 2003). Dadas as características da canavanina, sua presença como metabólito de *Acanthamoeba castellanii* não era esperada, uma vez que é tóxica para muitos organismos. No entanto, é possível sugerir que a canavanina atue durante o decorrer do encistamento reduzindo a produção de RNA e a replicação celular, como observado em outros organismos.

O ectocisto e endocisto formam a parede cística de *Acanthamoeba*, possuindo composições bioquímicas diferenciadas. Enquanto o endocisto é composto majoritariamente por celulose (KHAN, 2015), o ectocisto possui em sua composição, majoritariamente, a hidróxiprolina (BAUER, 1967). A trans-4-hidróxi-L-prolina

(hidróxiprolina) é formada durante a hidroxilação da prolina (GORRES; RAINES, 2010). Uma vez que a hidróxiprolina é um aminoácido, a diminuição de sua concentração observada neste estudo pode também estar relacionada à utilização de aminoácidos como fonte de energia (JEELANI *et al.*, 2012), tendo em vista que é um intermediário do ciclo de Krebs.

As poliaminas são essenciais para o crescimento normal, diferenciação e proliferação celulares, síntese de proteínas e de DNA em uma variedade de organismos (GEVREKCI, 2017; HANDA; FATIMA; MATTOO, 2018). Por isso, o metabolismo das poliaminas como alvo quimioterápico em protozoários tem sido amplamente estudado, uma vez que estão envolvidas em diversos processos celulares importantes (BACCHI; YARLETT, 2002). A acetilação de poliaminas e sua consequente inativação poderiam, dessa forma, garantir o seu armazenamento nas formas dormentes, fornecendo às células recém ativadas uma fonte prontamente disponível de poliaminas para propósitos de crescimento (GEVREKCI, 2017; SEILER, 1987), o que justificaria a diminuição da sua concentração durante o processo de encistamento. A diminuição da concentração de poliaminas durante o processo de encistamento de *Entamoeba invadens* e *Acanthamoeba castellanii* já foi demonstrada previamente (ANDERSON; LOFTUS, 2005; ZHU; CUMARASWAMY; HENNEY, 1989). Nas análises desse estudo, o 1,3-diaminopropano foi caracterizado como a poliamina mais abundante nas células em crescimento (nos trofozoítos), fato que já havia sido observado em outro estudo (BYERS *et al.*, 1991). A diminuição da concentração desse componente também foi observada com o avanço do encistamento, ou seja, foi possível detectar o 1,3-diaminopropano nos tempos de 0h e em menor quantidade no tempo de 24 horas, não sendo detectado no tempo seguinte. Esses resultados estão em acordo com os autores supracitados, que observaram a diminuição da concentração desse metabólito com o avanço do encistamento.

O 3-fosfoglicerato é uma importante molécula intermediária de diversos processos metabólicos, como a glicólise e o metabolismo de glicina, serina e treonina (BERG; STRYER; TYMOCZKO, 2014). Durante o encistamento de *Acanthamoeba*, ocorre a diminuição do metabolismo celular, incluindo o metabolismo da glicose como fonte energética (KHAN, 2006). Desse modo, a regulação negativa de metabólitos

envolvidos em seu metabolismo, como o 3-fosfoglicerato, era esperada. Da mesma forma, o ácido succínico também é intermediário de diversas vias metabólicas bioenergéticas importantes, como o ciclo do ácido cítrico da respiração aeróbia (BERG; STRYER; TYMOCZKO, 2014). Apesar de *Acanthamoeba* ser um protozoário aeróbio estrito durante o estágio de trofozoíto e durante o processo de encistamento (BAND, 1963; BAND, 1959) os cistos possuem baixa atividade metabólica e podem sobreviver sob condições anaeróbias (BAND, 1963). Assim, é esperada a diminuição da concentração de compostos envolvidos na respiração aeróbia durante o encistamento, como o ácido succínico.

Os ácidos graxos livres são indispensáveis na manutenção da vida, tendo grande importância na transdução de sinais, no crescimento e metabolismo (WU *et al.*, 2017). O ácido oleico é o ácido graxo mais abundante em protozoários (PALUSINSKA-SZYSZ *et al.*, 2014), inclusive *Acanthamoeba*, nos quais, juntamente com o ácido araquidônico, representam mais de metade do conteúdo de ácidos graxos (ULSAMER; SMITH; KORN, 1969) Tal distribuição sugere que esses compostos podem ter importante função no crescimento e metabolismo de protozoários (WU *et al.*, 2017). Em um estudo recente em que o secretoma de *Acanthamoeba castellanii* foi avaliado, as vesículas extracelulares foram morfológica e bioquimicamente caracterizadas, sendo possível detectar, em seu interior, o ácido oleico (GONÇALVES *et al.*, 2018). Observou-se, no presente estudo, uma diminuição considerável da concentração celular de ácido oleico com o decorrer do encistamento. Uma vez que o encistamento transcorre com a diminuição do metabolismo celular, a diminuição do ácido oleico observada sugere que de fato esse ácido graxo pode estar envolvido na manutenção do metabolismo celular.

Em 1962, Tomlinson e Jones sugeriram, pela primeira vez, que a celulose seria o principal componente da membrana cística de *Acanthamoeba*. Estudos da composição química dos cistos confirmaram que a formação da parede envolve a produção de celulose e proteínas ausentes nos trofozoítos (HIRUKAWA, YUKIKOA *et al.*, 1998). Posteriormente, confirmou-se a importância da celulose na composição da parede cística, uma vez que a inibição da enzima celulose sintase utilizando siRNA reduziu o encistamento em mais de 50% em *A. castellanii* (AQEEL; SIDDIQUI; KHAN, 2013). A celulose é um dos polissacarídeos fibrosos mais bem caracterizados

presentes em plantas e algumas algas. A estrutura básica deste carboidrato é composta por celobiose, um dissacarídeo formado por duas glicoses unidas por uma ligação $\beta(1\rightarrow4)$ (OUELLETTE; RAWN, 2015). No entanto, os mecanismos metabólicos de quebra do glicogênio, usado como reserva de glicose intracelular, para sua conversão em celulose ainda devem ser melhor esclarecidos (MOON; KONG, 2012). No presente estudo, foi observado um aumento da celobiose entre os tempos de 0 horas e 72 horas, o que é consistente com a formação da parede cística através da polimerização de moléculas de glicose em celobiose que, posteriormente, formam a celulose. De forma interessante, a celobiose mostrou-se como um dos poucos metabólitos cuja concentração aumentou com o avanço do encistamento, reforçando a importância da celulose na composição da parede celular dos cistos. Os processos envolvidos na formação da parede cística da ameba constituem alvos quimioterápicos promissores para a inibição do processo de encistamento (ANWAR; KHAN; SIDDIQUI, 2018), uma vez que a degradação da parede de celulose facilitaria a eliminação do parasito em seu interior (LAKHUNDI; SIDDIQUI; KHAN, 2015). As enzimas que catalisam a hidrólise de carboidratos complexos podem ser potenciais agentes na degradação da parede cística, através da quebra de ligações entre açúcares (DUDLEY *et al.*, 2009). Após a degradação da parede, torna-se mais fácil eliminar o microrganismo, como demonstrado por um estudo em que a exposição dos cistos à enzima celulase, em combinação com clorexidina, potencializou a eliminação dos mesmos (ABJANI *et al.*, 2016).

Através do enriquecimento realizado no software MBRole foi possível identificar a relação dos metabólitos leucina, isoleucina, prolina, serina, treonina, mio-inositol, celobiose e lactose com os transportadores do tipo ABC, utilizando os dados depositados sobre o metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* e *Naegleria fowleri*. O transporte das moléculas inorgânicas e orgânicas essenciais à manutenção de todas as formas de vida é feita através das membranas celulares, permitindo a existência de uma condição de equilíbrio entre os meios intracelular e extracelular (WILKENS, 2015). Muitas vezes, esse transporte é mediado por proteínas transportadoras integrais, sendo as proteínas transportadoras do tipo ABC (*ATP Binding Cassette*) as componentes de uma das maiores classes de proteínas transportadoras. Através da hidrólise de ATP para produção de energia, elas transportam uma grande variedade de substratos, como íons, açúcares, aminoácidos,

polipeptídeos, metabólitos tóxicos, drogas e toxinas (XIONG *et al.*, 2015). Salvo raras exceções, os transportadores ABC transportam substratos contra um gradiente químico e, em condições fisiológicas, operam em uma única direção, de importação ou exportação (WILKENS, 2015).

Enquanto bactérias possuem transportadores ABC de exportação e importação, os transportadores ABC de eucariotos são quase exclusivamente exportadores de substratos, necessários na eliminação de uma variedade de compostos anti-parasitários e responsáveis, muitas vezes, pelo desenvolvimento de resistência a drogas pelo parasito (DEAN *et al.*, 2014). Estudos genômicos mostraram que os transportadores ABC são amplamente distribuídos entre os protozoários parasitas e constituem uma das maiores famílias de transportadores (KAY *et al.*, 2012).

A superfamília dos transportadores ABC se divide em oito subgrupos (A-H), diferenciando-se quanto à homologia, número e arranjo de seus domínios, localização celular e função. As famílias B, C e G são intimamente ligadas com o transporte de drogas, bombeando diversos compostos para fora da célula, contra o gradiente de concentração, em um processo dependente de energia (HIGGINS; LINTON, 2004). Trata-se de um dos mecanismos de resistência a drogas mais bem conhecidos, se mantendo conservado de bactérias até o homem (LAGE, 2003).

Estudos que avaliaram métodos de desinfecção de instrumentos como o broncoscópio demonstraram que as recomendações de imersão dos mesmos em solução a 2% de glutaraldeído por 20 a 45 minutos, assim como a imersão em ácido paracético por 10 minutos foram ineficientes na eliminação de *A. polyphaga* (GREUB; RAOULT, 2003). Além disso, o tempo necessário para inativar cistos de *A. polyphaga* com soluções geralmente utilizadas em desinfecção hospitalar, como polietileno glicol diluído em álcool, é muito maior que para formas de resistência de outros microrganismos, como esporos de algumas bactérias. Ademais, outro estudo observou a ineficácia das soluções de desinfecção de lentes de contato na inativação dos cistos de *Acanthamoeba* e, no caso de algumas soluções, até mesmo dos trofozoítos (LAKHUNDI; KHAN; SIDDIQUI, 2014).

Mesmo não havendo estudos demonstrando a importância dos transportadores ABC especificamente em *Acanthamoeba*, é possível que estejam envolvidos na ineficiência de soluções de desinfecção utilizadas, por exemplo, em instrumentos médicos ou na desinfecção de lentes de contato (GREUB; RAOULT, 2003; LAKHUNDI; KHAN; SIDDIQUI, 2014). Uma outra possibilidade é o papel dessa classe de moléculas na resistência a drogas, já reportada em cepas obtidas de infecções por *Acanthamoeba* (HUANG *et al.*, 2017). Assim, é necessário um melhor entendimento da função dos transportadores ABC em *Acanthamoeba*, uma vez que a ineficácia na eliminação do parasito pode estar relacionada à maior incidência das doenças a ela relacionadas.

Ainda sobre os transportadores ABC, estudos envolvendo o ciliado *Pseudourostyla cristata* mostraram que o gene dos transportadores ABC se encontra superexpresso em seu cisto (GAO *et al.*, 2015). De forma contrária, o presente trabalho relacionou oito metabólitos com a via dos transportadores ABC, dos quais sete diminuíram significativamente de concentração intracelular entre os tempos de 24 horas e 72 horas, demonstrando a regulação negativa desses transportadores nos cistos. Avaliando esses resultados contrários, pode-se sugerir que a avaliação da expressão de vias metabólicas é mais adequada através de estudos metabolômicos, uma vez que é maior a sua proximidade com o fenótipo que com a regulação gênica.

A princípio, acreditava-se que as proteases estariam envolvidas apenas no processo de patogênese ou de fagocitose de *Acanthamoeba*, uma vez que atuam no meio extracelular degradando substratos (SERRANO-LUNA *et al.*, 2006). No entanto, o envolvimento das proteases no processo de encistamento foi confirmado por outros estudos, que observaram a função de serino proteases na degradação de organelas e proteínas durante o encistamento (LEE *et al.*, 2015; MOON *et al.*, 2008), uma vez que durante esse processo diminuem os níveis celulares de RNA, proteínas, triglicerídeos e glicogênio, conseqüentemente, diminuindo o volume celular (WEISMAN, 1976). Relacionando-se nossas observações quanto à regulação negativa da via dos transportadores ABC nos cistos - assim como sua função na exportação de moléculas - com a degradação de boa parte do conteúdo celular por proteases durante o encistamento, é possível sugerir que, durante o processo de

encistamento de *Acanthamoeba*, os transportadores ABC tem um importante papel na eliminação do produto da degradação intracelular de organelas e macromoléculas.

Os aminoácidos leucina, isoleucina e treonina foram relacionadas, no enriquecimento de vias, à via da biossíntese de leucina, isoleucina e valina, componentes do grupo dos aminoácidos ramificados (*branched chain amino acid*). Dentre os aminoácidos encontrados na natureza, os aminoácidos ramificados (BCAA) incluem a leucina, isoleucina e valina e tem importantes funções fisiológicas em eucariotos e procariotos (NIE *et al.*, 2018). Em bactérias, esses aminoácidos são quantitativamente importantes, uma vez que correspondem a 20% dos aminoácidos presentes em *Escherichia coli*. Por isso, têm sido amplamente estudadas e já foram identificadas em vários gêneros bacterianos (GARAULT *et al.*, 2000).

Já entre os eucariotos, como *Trypanosoma cruzi*, por exemplo, esses aminoácidos têm funções diversas. Em epimastigotas os BCAA são utilizados como fonte de carbono e energia, sendo que seu catabolismo produz intermediários que atuam no ciclo do ácido tricarboxílico. Além disso, a leucina pode ser utilizada como fonte de carbono para a biossíntese de esteróis e ácidos graxos (MANCHOLA *et al.*, 2016). Apesar de não haverem estudos indicando as funções específicas desses aminoácidos em *Acanthamoeba*, é possível supor que possuem importância, por exemplo, como fonte de energia e carbono, assim como em outros microrganismos.

Além disso, os aminoácidos glicina, serina e treonina foram relacionados no enriquecimento de vias à via do metabolismo desses aminoácidos. Trata-se de aminoácidos importantes no metabolismo de *Acanthamoeba* e um estudo já relacionou um aumento no crescimento dessa ameba ao aminoácido glicina (ADAM, 1964). Esse aumento é esperado, uma vez que a glicina é fundamental em diversos processos de biossíntese, como de outros aminoácidos, ácidos nucleicos e fosfolípidos (DE KONING *et al.*, 2003). Dessa forma, é clara a importância desses aminoácidos na manutenção do metabolismo de *Acanthamoeba*.

Observa-se na literatura científica uma escassez de estudos no que diz respeito aos processos bioquímicos de *Acanthamoeba*, inclusive seu metabolismo. Este trabalho representa o primeiro estudo metabolômico do tipo *untargeted* para *Acanthamoeba*, possibilitando uma visão ampla do metabolismo como um todo

durante o processo de encistamento, e não apenas de classes específicas de biomoléculas. Dessa forma, trata-se de um trabalho inédito no que diz respeito à tentativa de relacionar vias metabólicas importantes no processo de encistamento.

Dado o aumento da frequência de fatores de risco relacionados às infecções causadas por esse microrganismo, como o uso de lentes de contato e as doenças imunossupressoras, torna-se evidente a importância das doenças causadas por *Acanthamoeba*. Além disso, os tratamentos atualmente empregados são de baixa eficácia, devido, principalmente, à capacidade desse protozoário desenvolver formas dormentes extremamente resistentes, o que resulta em falha terapêutica ou prolongamento do tratamento. Neste estudo, foi possível confirmar a diminuição do metabolismo celular com o avanço do encistamento, como já observado em outros organismos. Além disso, sugere-se importantes alterações no metabolismo energético durante o processo, com troca da fonte de energia com a finalidade de utilização da glicose na produção da parede cística. É importante a continuidade da investigação de processos relacionados à produção da parede cística e possíveis abordagens seriam, por exemplo, a metabolômica do tipo *targeted*, utilizando um viés para carboidratos e aminoácidos, ou mesmo a marcação com isótopos estáveis, a fim de se avaliar o fluxo metabólico nos sistemas biológicos.

7 CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo a utilizar uma abordagem metabolômica do tipo *untargeted* para análise do processo de encistamento de *Acanthamoeba*, mostrando uma clara diferença no perfil metabólico das formas trofozoíto, pré-cisto e cisto. A análise de 18 metabólitos considerados estatisticamente significativos permitiu corroborar dados anteriores sobre a formação do cisto, como a diminuição do metabolismo celular e a formação de uma parede resistente de celulose. Além disso, o enriquecimento de vias metabólicas sugeriu a participação do sistema de transportadores ABC no encistamento, fato não reportado anteriormente para *Acanthamoeba*. Esse trabalho descreveu uma metodologia de extração de metabólitos aplicável a cistos de *Acanthamoeba* e forneceu informações inéditas sobre o processo de encistamento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABJANI, F. *et al.* Targeting cyst wall is an effective strategy in improving the efficacy of marketed contact lens disinfecting solutions against *Acanthamoeba castellanii* cysts. *Contact Lens and Anterior Eye*, v. 39, n. 3, p. 239–243, jun. 2016.

ADAM, K. M. G. The Amino Acid Requirements of *Acanthamoeba* sp. Neff. *The Journal of Protozoology*, v. 11, n. 1, p. 98–100, fev. 1964.

AICHELBURG, A. C. *et al.* Successful Treatment of Disseminated *Acanthamoeba* sp. Infection with Miltefosine. *@BULLET*, v. 14, n. 11, 2008.

AKSOZEK, A. *et al.* Resistance of *Acanthamoeba castellanii* Cysts to Physical, Chemical, and Radiological Conditions. *Journal of Parasitology*, v. 88, n. 3, p. 621–623, 24 jan. 2009.

AL-HERRAWY, A. *et al.* *Acanthamoeba* species in Swimming Pools of Cairo, Egypt. *Iranian J Parasitol*, v. 9, n. 2, p. 194–201, 2014.

ALBERGHINA, L.; WESTERHOFF, H. . *What is systems biology? From genes to function and back*, 2005.

ALFIERI, S. C. *et al.* Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *The Journal of parasitology*, v. 86, n. 2, p. 220–227, 2000.

ANDERSON, I. J.; LOFTUS, B. J. *Entamoeba histolytica*: Observations on metabolism based on the genome sequence. *Experimental Parasitology*, v. 110, n. 3, p. 173–177, 1 jul. 2005.

ANWAR, A.; KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. Combating *Acanthamoeba* spp. cysts: what are the options? *Parasites & vectors*, v. 11, n. 1, p. 26, 2018.

AQEEL, Y. *et al.* The effect of different environmental conditions on the encystation of *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. *Experimental Parasitology*, v. 135, n. 1, p. 30–35, set. 2013.

AQEEL, Y.; SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Silencing of xylose isomerase and cellulose

synthase by siRNA inhibits encystation in *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitology Research*, v. 112, n. 3, p. 1221–1227, 28 mar. 2013.

ARIAS FERNANDEZ, M. C. *et al.* Marine amoebae from waters of northwest Spain, with comments on a potentially pathogenic euryhaline species. *The Journal of protozoology*, v. 36, n. 3, p. 239–41, 1989.

ARNALICH-MONTIEL, F. *et al.* Influence of *Acanthamoeba* Genotype on Clinical Course and Outcomes for Patients with *Acanthamoeba* Keratitis in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 4, p. 1213–1216, 1 abr. 2014.

BACCHI, C.; YARLETT, N. Polyamine Metabolism as Chemotherapeutic Target in Protozoan Parasites. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 2, n. 6, p. 553–563, 1 dez. 2002.

BAGHERI, H. *et al.* Isolation of *Acanthamoeba* Spp. from Drinking Waters in Several Hospitals of Iran. *Iranian J Parasitol*, v. 5, n. 2, p. 19–25, 2010.

BAIG, A. M.; KHAN, N. A. A proposed cascade of vascular events leading to granulomatous amoebic encephalitis. *Microbial Pathogenesis*, v. 88, p. 48–51, 2015.

BAND, R. N. Extrinsic requirements for encystation by soil amoeba, *Hartmannella rhyssodes*. *The Journal of protozoology*, v. 10, p. 101–6, fev. 1963.

BAND, R. N. Nutritional and Related Biological Studies on the Free-Living Soil Amoeba, *Hurtmunnella rhyssodes*. 1959.

BAUER, H. Ultrastruktur und Zellwandbildung von *Acanthamoeba* sp. *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich*, n. 112, p. 173–186, 1967.

BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. *Bioquímica*. 7 ed ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2014.

BOOTON, G. C. *et al.* Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 4, p. 1689–1693, 2005.

- BORATTO, P. *et al.* Acanthamoeba polyphaga mimivirus prevents amoebal encystment-mediating serine proteinase expression and circumvents cell encystment. *Journal of virology*, v. 89, n. 5, p. 2962–5, 1 mar. 2015.
- BOUYER, S. *et al.* Acanthamoeba castellanii: proteins involved in actin dynamics, glycolysis, and proteolysis are regulated during encystation. *Experimental parasitology*, v. 123, n. 1, p. 90–4, set. 2009.
- BYERS, T. J. *et al.* Molecular aspects of the cell cycle and encystment of Acanthamoeba. *Reviews of infectious diseases*, v. 13 Suppl 5, p. S373-84, 1991.
- CADIMA, J.; JOLLIFFE, I. T. Principal component analysis: a review and recent developments. 2016.
- CAUMO, K. S. *et al.* Proteomic profiling of the infective trophozoite stage of Acanthamoeba polyphaga. *Acta Tropica*, v. 140, p. 166–172, dez. 2014.
- CHAN, L.-L. *et al.* Isolation and characterization of Acanthamoeba spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta Tropica*, v. 117, n. 1, p. 23–30, 1 jan. 2011.
- CHAPPELL, C. L. *et al.* Standardized method of measuring acanthamoeba antibodies in sera from healthy human subjects. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 8, n. 4, p. 724–30, jul. 2001.
- CHAVEZ-MUNGUÍA, B. *et al.* Ultrastructural Study of Encystation and Excystation in Acanthamoeba castellanii. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 52, n. 2, p. 153–158, mar. 2005.
- CHÁVEZ-MUNGUÍA, B. *et al.* Acanthamoeba castellanii cysts: new ultrastructural findings. *Parasitology Research*, v. 112, n. 3, p. 1125–1130, 15 mar. 2013.
- CLARKE, D. W.; NIEDERKORN, J. Y. The pathophysiology of Acanthamoeba keratitis. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 4, p. 175–180, 2006.
- CLARKE, M. *et al.* Genome of Acanthamoeba castellanii highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biology*, v. 14, p. R11, 2013.

COHEN, E. J. *et al.* Diagnosis and Management of Acanthamoeba Keratitis. *American Journal of Ophthalmology*, v. 100, n. 3, p. 389–395, set. 1985.

COLLINS, F. S. *et al.* A vision for the future of genomics research. *Nature*, v. 422, n. 6934, p. 835–847, 14 abr. 2003.

CORDINGLEY, J. S.; WILLIS, R. A.; VILLEMEZ, C. L. Osmolarity is an independent trigger of Acanthamoeba castellanii differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 61, n. 2, p. 167–171, 1996.

CORSARO, D. *et al.* Acanthamoeba misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for Acanthamoeba micheli sp. nov. (genotype T19). *Parasitology Research*, v. 114, n. 7, p. 2481–2490, 15 jul. 2015.

CORSARO, D.; VENDITTI, D. Phylogenetic evidence for a new genotype of Acanthamoeba (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitology Research*, v. 107, n. 1, p. 233–238, 2010.

CREEK, D. J. *et al.* Metabolomic analysis of trypanosomatid protozoa. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 181, n. 2, p. 73–84, fev. 2012.

CRUZ, A. R. S.; RIVERA, W. L. Genotype analysis of Acanthamoeba isolated from human nasal swabs in the Philippines. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 7, p. S74–S78, set. 2014.

CULBERTSON, C. G. *et al.* Experimental Infection of Mice and Monkeys by Acanthamoeba. *The American journal of pathology*, v. 35, n. 1, p. 185–197, 1959.

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

DE KONING, T. J. *et al.* L-Serine in disease and development. *Biochem. J*, v. 371, p. 653–661, 2003.

DE MORAES, J.; ALFIERI, S. C. Growth, encystment and survival of Acanthamoeba castellanii grazing on different bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 66, n. 2, p. 221–229, 1 nov. 2008.

- DEAN, P. *et al.* Transport proteins of parasitic protists and their role in nutrient salvage. 2014.
- DUARTE, J. L. *et al.* Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. *Experimental Parasitology*, v. 135, n. 1, p. 9–14, 2013.
- DUDLEY, R. *et al.* *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cysts do not bind to human corneal epithelial cells. *Acta Tropica*, v. 95, n. 2, p. 100–108, 2005.
- DUDLEY, R.; ALSAM, S.; KHAN, N. A. Cellulose biosynthesis pathway is a potential target in the improved treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 75, n. 1, p. 133–140, 17 abr. 2007.
- DUDLEY, R.; JARROLL, E. L.; KHAN, N. A. Carbohydrate analysis of *Acanthamoeba castellanii*. *Experimental Parasitology*, v. 122, n. 4, p. 338–343, ago. 2009a.
- DUDLEY, R.; JARROLL, E. L.; KHAN, N. A. Carbohydrate analysis of *Acanthamoeba castellanii*. *Experimental Parasitology*, v. 122, n. 4, p. 338–343, 1 ago. 2009b.
- DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, n. 4, p. 285–294, 2005.
- FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, v. 48, n. 1/2, p. 155–171, 2002.
- FOUQUE, E. *et al.* Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryotic cell*, v. 11, n. 4, p. 382–7, 1 abr. 2012.
- GAO, X. *et al.* Large-scale identification of encystment-related proteins and genes in *Pseudourostyla cristata*. *Scientific Reports*, v. 5, p. 1–16, 2015.
- GARAULT, P. *et al.* Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis Is Essential for Optimal Growth of *Streptococcus thermophilus* in Milk. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, v. 66, n. 12, p. 5128–5133, 2000.
- GARCIA, A.; BARBAS, C. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)-Based

Metabolomics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. [S.l: s.n.], 2011. v. 708. p. 191–204.

GEVREKCI, A. Ö. The roles of polyamines in microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 11, p. 204, 27 nov. 2017.

GONÇALVES, D. DE S. *et al.* Extracellular vesicles and vesicle-free secretome of the protozoa *Acanthamoeba castellanii* under homeostasis and nutritional stress and their damaging potential to host cells. *Virulence*, v. 9, n. 1, p. 818–836, 2018.

GORRES, K. L.; RAINES, R. T. Prolyl 4-hydroxylase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 45, n. 2, p. 106–124, 4 abr. 2010.

GRAFFI, S. *et al.* *Acanthamoeba* keratitis: study of the 5-year incidence in Israel. *Br J Ophthalmol*, v. 97, p. 1382–1383, 2013.

GREUB, G.; RAOULT, D. Biocides Currently Used for Bronchoscope Decontamination Are Poorly Effective Against Free-Living Amoebae. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 24, n. 10, p. 784–786, 2 out. 2003.

HALKET, J. M. *et al.* Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 410, p. 219–243, jan. 2005.

HANDA, A. K.; FATIMA, T.; MATTOO, A. K. Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. *Frontiers in Chemistry*, v. 6, p. 10, 5 fev. 2018.

HIGGINS, C. F.; LINTON, K. J. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 11, n. 10, p. 918–926, 1 out. 2004.

HIRUKAWA, Y. *et al.* Structure and expression of a cyst specific protein of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, v. 1398, n. 1, p. 47–56, 1998a.

HIRUKAWA, Y. *et al.* Structure and expression of a cyst specific protein of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, v. 1398, n. 1, p. 47–56, maio 1998b.

HIRUKAWA, Y. *et al.* Structure and expression of a cyst specific protein of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, v. 1398, n. 1, p. 47–56, 29 maio 1998.

HUANG, F.-C. *et al.* Characterizing clinical isolates of *Acanthamoeba castellanii* with high resistance to polyhexamethylene biguanide in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 50, n. 5, p. 570–577, out. 2017.

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

JAGER, B. V.; STAMM, W. P. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *The Lancet*, v. 23, p. 1343–1345, 1972.

JAHNES, W. G.; FULLMER, H. M. Free living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, v. 96, n. 2, p. 484–8, nov. 1957.

JEELANI, G. *et al.* Metabolic Profiling of the Protozoan Parasite *Entamoeba invadens* Revealed Activation of Unpredicted Pathway during Encystation. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, p. e37740, 25 maio 2012.

JOHNSTON, S. P. *et al.* Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection in multiple contact lens solutions. *Journal of clinical microbiology*, v. 47, n. 7, p. 2040–5, 1 jul. 2009.

KAMO, T. *et al.* Cyanamide is biosynthesized from l-canavanine in plants. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, p. 10527, 27 set. 2015.

KAY, C. *et al.* The ATP-Binding Cassette Proteins of the Deep- Branching Protozoan Parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n. 6, 2012.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30, n. 4, p. 564–595, jul. 2006.

- KHAN, N. A. *Acanthamoeba : biology and pathogenesis*. 2. ed. [S.l: s.n.], 2015.
- KHAN, N. A.; PAGET, T. A. Molecular Tools for Speciation and Epidemiological Studies of *Acanthamoeba*. *Current Microbiology*, v. 44, n. 6, p. 444–449, 25 jun. 2002.
- KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. The Neuropathogenesis of *Acanthamoeba* encephalitis : Barriers to Overcome. *J Cell Sci Ther*, p. 1–6, 2011.
- KIM, S.-H. *et al.* Autophagy protein 12 plays an essential role in *Acanthamoeba* encystation. *Experimental Parasitology*, v. 159, p. 46–52, dez. 2015.
- KLASSEN, A. *et al.* *Metabolomics: Definitions and Significance in Systems Biology*. [S.l: s.n.], 2017. v. 965.
- KLOTZ, S. A.; MISRA, R. P.; BUTRUS, S. I. Carbohydrate deposits on the surfaces of worn extended-wear soft contact lenses. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, v. 105, n. 7, p. 974–7, jul. 1987.
- KOEHLER, M. *et al.* *Acanthamoeba castellanii*: growth on human cell layers reactivates attenuated properties after prolonged axenic culture. *FEMS Microbiology Letters*, v. 299, n. 2, p. 121–127, 2009.
- KRASTANOV, A. Metabolomics—The State of Art. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 24, n. 1, p. 1537–1543, 15 jan. 2010.
- KUMAR, A. *et al.* Mass spectrometry-based proteomic analysis of *Leishmania donovani* soluble proteins in Indian clinical isolate. *Pathogens and Disease*, v. 70, n. 1, p. 84–87, 1 fev. 2014.
- KUMAR, A.; KUMAR, H. D. Canavanine-Induced inhibition of growth and heterocyst differentiation in *Anabaena doliolum* and isolation of a canavanine-resistant mutant. *Journal of Biosciences*, v. 3, n. 1, p. 41–49, mar. 1981.
- LACKNER, P. *et al.* Acute Granulomatous *Acanthamoeba* Encephalitis in an Immunocompetent Patient. *Neurocritical Care*, v. 12, n. 1, p. 91–94, 22 fev. 2010.
- LAGE, H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *International journal of antimicrobial agents*, v. 22, n. 3, p. 188–99,

set. 2003.

LAKHUNDI, S.; KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. Inefficacy of marketed contact lens disinfection solutions against keratitis-causing *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. *Experimental Parasitology*, v. 141, p. 122–128, jun. 2014.

LAKHUNDI, S.; SIDDIQUI, R.; KHAN, N. Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of *Acanthamoeba* infections. *Parasites & Vectors*, v. 8, n. 1, p. 23, 14 jan. 2015.

LALITHA, P. *et al.* *Acanthamoeba* keratitis in South India: a longitudinal analysis of epidemics. *Ophthalmic epidemiology*, v. 19, n. 2, p. 111–5, 2012.

LEE, G. A. *et al.* *Acanthamoeba* sclerokeratitis: treatment with systemic immunosuppression. *Ophthalmology*, v. 109, n. 6, p. 1178–82, jun. 2002.

LEE, Y.-R. *et al.* Essential Role for an M17 Leucine Aminopeptidase in Encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *PloS one*, v. 10, n. 6, p. e0129884, 2015.

LEITSCH, D. *et al.* Major Role for Cysteine Proteases during the Early Phase of *Acanthamoeba castellanii* Encystment. *EUKARYOTIC CELL*, v. 9, n. 4, p. 611–618, 2010.

LLOYD, D. Encystment in *Acanthamoeba castellanii*: A review. *Experimental Parasitology*, v. 145, p. S20–S27, 1 nov. 2014.

LORENZO-MORALES, J. *et al.* *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends in Parasitology*, v. 29, n. 4, p. 181–187, abr. 2013a.

LORENZO-MORALES, J. *et al.* *Acanthamoeba* keratitis: An emerging disease gathering importance worldwide? *Trends in Parasitology*, v. 29, n. 4, p. 181–187, 2013b.

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

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

LUNA-NÁCAR, M. *et al.* Proteomic study of *Entamoeba histolytica* trophozoites, cysts, and cyst-like structures. *PLoS ONE*, v. 11, n. 5, p. 1–24, 2016.

MAGHSOOD, A. H. *et al.* *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*, v. 54, n. 8, p. 755–759, 1 ago. 2005.

MAGNET, A.; HENRIQUES-GIL, N.; GALVÁN-DÍAZ, A. L.; *et al.* Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitology Research*, v. 113, n. 8, p. 2845–2850, 2014.

MAGNET, A.; HENRIQUES-GIL, N.; GALVÁN-DÍAZ, A. L.; *et al.* Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitology Research*, v. 113, n. 8, p. 2845–2850, 25 ago. 2014.

MANCHOLA, N. C. *et al.* Biochemical Characterization of Branched Chain Amino Acids Uptake in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 63, n. 3, p. 299–308, maio 2016.

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

MARITSCHNEGG, P. *et al.* Granulomatous amebic encephalitis in a child with acute lymphoblastic leukemia successfully treated with multimodal antimicrobial therapy and hyperbaric oxygen. *Journal of clinical microbiology*, v. 49, n. 1, p. 446–8, jan. 2011.

MARTÍN-NAVARRO, C. M. *et al.* Evaluation of the in vitro activity of commercially available moxifloxacin and voriconazole eye-drops against clinical strains of *Acanthamoeba*. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, v. 251, n. 9, p. 2111–2117, 19 set. 2013.

MARTINEZ, A. J. *Acanthamoebiasis* and immunosuppression. Case report. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, v. 41, n. 5, p. 548–57, set. 1982.

MARTINEZ, A. J. Infection of the central nervous system due to Acanthamoeba. *Reviews of infectious diseases*, v. 13 Suppl 5, p. S399-402, 1991.

MARTINEZ, A. J.; VISVESVARA, G. S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, v. 7, n. 1, p. 583–98, jan. 1997.

MARTINEZ, A. J.; VISVESVARA, G. S. Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: Naegleria, Acanthamoeba, and Leptomyxid. *Clinics in laboratory medicine*, v. 11, n. 4, p. 861–72, dez. 1991.

MARUJO, F. I. *et al.* Distribuição das ceratites infecciosas em hospital terciário no Brasil. *Arq Bras Oftalmol*, v. 76, n. 6, p. 370–3, 2013.

MASCHIO, V. J. *et al.* Acanthamoeba T4, T5 and T11 Isolated From Mineral Water Bottles in Southern Brazil. *Current Microbiology*, v. 70, n. 1, p. 6–9, 15 jan. 2015.

MATHEUS, N. *et al.* An Easy, Convenient Cell and Tissue Extraction Protocol for Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics. *Phytochemical Analysis*, v. 25, n. 4, p. 342–349, jul. 2014.

MAYCOCK, N. J. R.; JAYASWAL, R.; ED, F. Update on Acanthamoeba Keratitis : Diagnosis, Treatment and Outcomes. *Cornea*, v. 35, n. 5, p. 713–720, 2016.

MAZUR, T.; HADAŚ, E.; IWANICKA, I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of Acanthamoeba isolates. *Tropical medicine and parasitology : official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ)*, v. 46, n. 2, p. 106–8, jun. 1995.

MCKELLAR, M. S. *et al.* Fatal granulomatous Acanthamoeba encephalitis mimicking a stroke, diagnosed by correlation of results of sequential magnetic resonance imaging, biopsy, in vitro culture, immunofluorescence analysis, and molecular analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 11, p. 4265–4269, 2006.

MOON, E.-K. *et al.* Characterization of a serine proteinase mediating encystation of Acanthamoeba. *Eukaryotic cell*, v. 7, n. 9, p. 1513–7, set. 2008.

MOON, E.-K. *et al.* Cysteine protease involving in autophagosomal degradation of mitochondria during encystation of Acanthamoeba. *Molecular and Biochemical*

Parasitology, v. 185, n. 2, p. 121–126, out. 2012.

MOON, E.-K. *et al.* Down-Regulation of Cellulose Synthase Inhibits the Formation of Endocysts in *Acanthamoeba*. *The Korean Journal of Parasitology*, v. 52, n. 2, p. 131–135, 18 abr. 2014.

MOON, E. K.; KONG, H. H. Short-cut pathway to synthesize cellulose of encysting *Acanthamoeba*. *Korean Journal of Parasitology*, v. 50, n. 4, p. 361–364, 2012.

MURAKAWA, G. J. Disseminated Acanthamebiasis in Patients With AIDS. *Archives of Dermatology*, v. 131, n. 11, p. 1291, 1 nov. 1995.

NAGINGTON, J. *et al.* Amoebic Infection of the Eye. *The Lancet*, v. 304, n. 7896, p. 1537–1540, 1974.

NEFF, R. J. *et al.* Induction of Synchronous Encystment. *Division of Molecular Biology*, p. 55–83, 1964.

NEFF, R. J.; NEFF, R. H. The biochemistry of amoebic encystment. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, v. 23, p. 51–81, 1969.

NEVEDOMSKAYA, E.; MAYBORODA, O. A.; DEELDER, A. M. Cross-platform analysis of longitudinal data in metabolomics. *Molecular BioSystems*, v. 7, n. 12, p. 3214, dez. 2011.

NIE, C. *et al.* Branched Chain Amino Acids: Beyond Nutrition Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 4, p. 954, 23 mar. 2018.

NIEDERKORN, J. Y. *et al.* The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes and Infection*, v. 1, n. 6, p. 437–443, 1999.

ORATA, F. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, 2012.

OUELLETTE, R. J.; RAWN, J. D. *Principles of organic chemistry*. [S.l.]: Elsevier, 2015.

PAGE, F. C. Re-Definition of the Genus *Acanthamoeba* with Descriptions of Three

- Species. *The Journal of Protozoology*, v. 14, n. 4, p. 709–724, nov. 1967.
- PAGET, T. *et al.* Metabolomics and protozoan parasites. *Acta Parasitologica*, v. 58, n. 2, p. 127–131, 2013.
- PALUSINSKA-SZYSZ, M. *et al.* Identification of Unusual Phospholipid Fatty Acyl Compositions of *Acanthamoeba castellanii*. *PLoS ONE*, v. 9, n. 7, p. e101243, 9 jul. 2014.
- PARK, J. T.; JEONG, Y. E.; AHN, T. I. Changes in Profiles of Major Proteins in Encysting *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J Biol Sci*, v. 6, p. 341–347, 2002a.
- PARK, J. T.; JEONG, Y. E.; AHN, T. I. Changes in Profiles of Major Proteins in Encysting *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J Biol Sci*, v. 6, p. 341–347, 2002b.
- PEREIRA, C. A. *et al.* Screening of Substrate Analogs as Potential Enzyme Inhibitors for the Arginine Kinase of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 50, n. 2, p. 132–134, mar. 2003.
- PINU, F. R.; VILLAS-BOAS, S. G.; AGGIO, R. Analysis of Intracellular Metabolites from Microorganisms: Quenching and Extraction Protocols. *Metabolites*, v. 7, n. 4, 23 out. 2017.
- PUSSARD, M., PONS, R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, v. 13, n. 4, p. 557–598, 1977.
- PUSSARD. Le genre *Acanthamoeba* Volkonsky 1931 (Hartmannellidae-Amoebida). *Protistologica*, v. 2, p. 71–93, 1966.
- RADFORD, C. F.; MINASSIAN, D. C.; DART, J. K. G. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *The British journal of ophthalmology*, v. 86, n. 5, p. 536–42, maio 2002.
- RAIZADA, M. K.; MURTI, C. R. K. Changes in the Activity of Certain Enzymes of *Hartmannella* (Culbertson strain A-1) During Encystment*. *The Journal of Protozoology*, v. 18, n. 1, p. 115–119, 1 fev. 1971.
- RAIZADA, M. K.; MURTI, C. R. K. Synthesis of RNA, Protein, Cellulose, and

Mucopolysaccharide and Changes in the Chemical Composition of *Hartmannella culbertsoni* During Encystment under Axenic Conditions*. *The Journal of Protozoology*, v. 19, n. 4, p. 691–695, 1 nov. 1972.

RIEKEBERG, E.; POWERS, R. New frontiers in metabolomics: from measurement to insight. *F1000Research*, v. 6, p. 1148, 2017.

ROBERTS, C. W.; HENRIQUEZ, F. L. Drug target identification, validation, characterisation and exploitation for treatment of *Acanthamoeba* (species) infections. *Experimental Parasitology*, v. 126, n. 1, p. 91–96, 2010.

ROCHFORT, S. Metabolomics Reviewed: A New “Omics” Platform Technology for Systems Biology and Implications for Natural Products Research. *Journal of Natural Products*, v. 68, n. 12, p. 1813–1820
ROCHFORT, S. Biology and Implications for, 2005.

ROSENTHAL, G. A. Nitrogen allocation for L-Canavanine synthesis and its relationship to chemical defense of the seed. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 5, n. 3, p. 219–220, 1 jan. 1977.

SCALBERT, A. *et al.* Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*, v. 5, n. 4, p. 435–458, dez. 2009.

SCHAAP, P.; SCHILDE, C. Encystation: the most prevalent and underinvestigated differentiation pathway of eukaryotes. *Microbiology*, v. 164, n. 5, p. 727–739, 1 maio 2018.

SHELTEMA, R. A. *et al.* The potential of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomics era. *Parasitology*, v. 137, n. 9, p. 1291–1302, 2010.

SCHROEDER, J. M. *et al.* Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of clinical microbiology*, v. 39, n. 5, p. 1903–11, maio 2001.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Veterinary Parasitology*, v. 126, n. 1–2, p. 91–120, 9 dez. 2004.

SCHWARTZ, J. H.; MAAS, W. K. Analysis of the inhibition of growth produced by canavanine in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, v. 79, n. 6, p. 794–9, jun. 1960.

SEILER, N. Functions of polyamine acetylation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 65, n. 10, p. 2024–2035, out. 1987.

SERRANO-LUNA, J. D. J. *et al.* Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. *Canadian journal of microbiology*, v. 52, n. 1, p. 16–23, 2006.

SIDDIQUI, R. *et al.* Area 51: How do *Acanthamoeba* invade the central nervous system? *Trends in Parasitology*, v. 27, n. 5, p. 185–189, 2011.

SIDDIQUI, R.; DUDLEY NAVEED AHMED KHAN, R. *Acanthamoeba* differentiation: a two-faced drama of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Parasitology*, v. 139, n. 7, p. 826–834, 2012.

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

SINGH, B. N. Nuclear Division in Nine Species of Small Free-Living Amoebae and Its Bearing on the Classification of the Order Amoebida. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 236, n. 636, p. 405–461, 25 jun. 1952.

SINGH, B. N.; DAS, S. R. Studies on pathogenic and non-pathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order amoebida. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 259, n. 832, p. 435–76, 22 out. 1970.

STEHR-GREEN, J. K. *et al.* *Acanthamoeba* keratitis in soft contact lens wearers. A case-control study. *JAMA*, v. 258, n. 1, p. 57–60, 3 jul. 1987.

STICCA, M. P. *et al.* *Acanthamoeba* keratitis in patients wearing scleral contact lenses. *Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association*, v. 0, 82

n. 0, 5 dez. 2017.

STOTHARD, D. R. *et al.* The Evolutionary History of the Genus *Acanthamoeba* and the Identification of Eight New 18S rRNA Gene Sequence Types. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 45, n. 1, p. 45–54, jan. 1998.

T'KINDT, R. *et al.* Towards an unbiased metabolic profiling of protozoan parasites: optimisation of a *Leishmania* sampling protocol for HILIC-orbitrap analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 398, n. 5, p. 2059–2069, 8 nov. 2010.

TOMLINSON, G.; JONES, E. A. Isolation of cellulose from the cyst wall of a soil amoeba. *Biochimica et biophysica acta*, v. 63, p. 194–200, 10 set. 1962.

TRIVEDI, D. K.; HOLLYWOOD, K. A.; GOODACRE, R. Metabolomics for the masses: The future of metabolomics in a personalized world. *New Horizons in Translational Medicine*, v. 3, n. 6, p. 294–305, 2017.

TZANETOU, K. *et al.* *Acanthamoeba* Keratitis and Contact Lens Disinfecting Solutions. *Ophthalmologica*, v. 220, n. 4, p. 238–241, 2006.

ULSAMER, A. G.; SMITH, F. R.; KORN, E. D. Lipids of *Acanthamoeba castellanii*. Composition and effects of phagocytosis on incorporation of radioactive precursors. *The Journal of cell biology*, v. 43, n. 1, p. 105–14, out. 1969.

VINCENT, I. M.; BARRETT, M. P. Metabolomic-Based Strategies for Anti-Parasite Drug Discovery. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 20, n. 1, p. 44–55, jan. 2015.

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

VISVESVARA, G. S.; SCHUSTER, F. L. Opportunistic Free-living Amebae, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter*, v. 30, n. 20, p. 151–158, 15 out. 2008.

WAMPFLER, P. B. *et al.* Proteomics of secretory and endocytic organelles in *Giardia lamblia*. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, 2014.

- WEBSTER, D. *et al.* Case report: Treatment of granulomatous amoebic encephalitis with voriconazole and miltefosine in an immunocompetent soldier. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 87, n. 4, p. 715–718, 2012.
- WEISMAN, R. A. Differentiation in *Acanthamoeba Castellanii*. *Annual Review of Microbiology*, v. 30, n. 1, p. 189–219, out. 1976.
- WESTERHUIS, J. A. *et al.* Assessment of PLSDA cross validation. *Metabolomics*, v. 4, n. 1, p. 81–89, 24 mar. 2008.
- WILKENS, S. Structure and mechanism of ABC transporters. v 7. n. 14. 2015.
- WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, v. 1, p. 92–107, 2013.
- WU, J. *et al.* Autophagy mediates free fatty acid effects on MDA-MB-231 cell proliferation, migration and invasion. *Oncology letters*, v. 14, n. 4, p. 4715–4721, out. 2017.
- XIONG, J. *et al.* Tracing the structural evolution of eukaryotic ATP binding cassette transporter superfamily. *Scientific reports*, v. 5, p. 16724, 18 nov. 2015.
- XUAN, Y. *et al.* Isolation and identification of *Acanthamoeba* strains from soil and tap water in Yanji, China. *Environmental health and preventive medicine*, v. 22, n. 1, p. 58, 30 jun. 2017.
- ZHU, C.-M.; CUMARASWAMY, A.; HENNEY, H. Comparison of polyamine and S-adenosylmethionine contents of growing and encysted *Acanthamoeba* isolates. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 90, n. 2, p. 145–153, out. 1989.

ANEXO A. Metabólitos detectados ao longo do encistamento de *Acanthamoeba castellanii* por GC-MS*

Metabólito	Classificação	Fórmula	Massa molar
Leucina	Aminoácidos, peptídeos e conjugados	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.175 g/mol
Prolina	Aminoácidos, peptídeos e conjugados	C ₅ H ₉ NO ₂	115.132 g/mol
Isoleucina	Aminoácidos, peptídeos e conjugados	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.175 g/mol
Serina	Aminoácidos, peptídeos e conjugados	C ₃ H ₇ NO ₃	105.093 g/mol
Treonina	Aminoácidos, peptídeos e conjugados	C ₄ H ₉ NO ₃	119.12 g/mol
Ácido succínico	Ácidos orgânicos e derivados	C ₄ H ₆ O ₄	118.088 g/mol
B-alanina	Aminoácidos, peptídeos e conjugados	C ₃ H ₇ NO ₂	89.094 g/mol
Hidroxiprolina	Aminoácidos, peptídeos e conjugados	C ₅ H ₉ NO ₃	131.131 g/mol
Ácido 4-guanidinobutírico	Ácidos orgânicos e derivados	C ₅ H ₁₁ N ₃ O ₂	145.162 g/mol
1,3-diaminopropano	Compostos nitrogenados e poliaminas	C ₃ H ₁₀ N ₂	74.127 g/mol
3-fosfoglicerato	Carboidratos	C ₃ H ₇ O ₇ P	186.056 g/mol
Tirosina	Aminoácidos, peptídeos e conjugados	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.191 g/mol
Canavanina	Aminoácidos, peptídeos e conjugados	C ₅ H ₁₂ N ₄ O ₃	176.176 g/mol
Mio-inositol	Carboidratos	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.156 g/mol
Metil oleato	Lipídeos e esteróis	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296.495 g/mol
Ácido esteárico	Lipídeos e esteróis	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.484 g/mol
Arbutina	Carboidrato	C ₁₂ H ₁₆ O ₇	272.253 g/mol
Celobiose	Carboidratos	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.297 g/mol
Lactose	Carboidratos	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.297 g/mol

*Os metabólitos identificados por GC-MS foram categorizados em classes bioquímicas com base nas informações disponíveis em: KEGG, PubChem, HMDB e ChEBI.

Molecular diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis: evaluation in rat model and application in suspected human cases

Adriana Oliveira Costa¹ · Cinthia Furst² · Lucas Oliveira Rocha³ ·
Cecília Cirelli¹ · Carolina Neris Cardoso¹ · Fagner Salmazo Neiva³ ·
Cynara Oliveira Possamai² · Daniel de Assis Santos⁴ · Vanete Thomaz-Soccol³

Received: 7 October 2016 / Accepted: 13 February 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract *Acanthamoeba* keratitis (AK) is a progressive corneal infection that demands rapid and sensitive techniques for diagnosis to avoid risk of visual impairment. We evaluated two DNA extraction techniques and a semi-nested-PCR (snPCR) targeting the 18S rRNA gene to detect *Acanthamoeba* cysts and trophozoites. The most effective protocol was evaluated in samples of corneal scrapings and biopsies from an AK rat model and applied to diagnosis of human cases of AK. DNA extraction performed with a commercial kit based on DNA binding to magnetic beads was more efficient than a method based on alkaline lysis, allowing the detection of one trophozoite and one cyst of *Acanthamoeba* in samples prepared from cultures. This technique and sn-PCR were applied in corneal scrapings of rats experimentally infected with *Acanthamoeba* ($n = 6$), resulting in 100% of positivity, against 16.7% ($n = 6$) of positive identification in culture method using non-nutrient agar (NNA) with *Escherichia coli*. Corneal biopsies from rats were also tested ($n = 6$) and resulted in positivity in all samples in both molecular and culture methods. Eight out of ten presumptive

human cases of *Acanthamoeba* keratitis were also confirmed by sn-PCR of scraping samples, while the culture method was positive in only four cases. We discuss that animal model of AK can be an efficient tool to validate diagnostic methods and conclude that DNA extraction with the kit and snPCR protocol described here is an effective alternative for diagnosis of AK.

Keywords *Acanthamoeba* keratitis · Rat model · Diagnosis · Semi-nested PCR · Culture

Introduction

Acanthamoeba keratitis (AK) is a progressive corneal infection that can cause irreversible vision impairment. The illness is characterized by severe pain, usually disproportionate to the clinical signs, punctate keratopathy, tearing, photophobia, and stromal ring infiltrates (Maycock et al. 2016). Contact lenses users are more likely to acquire AK, representing 62 to 71% of cases (Radford et al. 2002). Corneal traumatic lesions caused by a foreign body followed by exposure to contaminated water can also be a source of AK (Marciano-Cabral and Cabral 2003).

AK requires early diagnosis for a rapid therapeutic intervention, since the prognosis worsens if an effective therapy is not introduced within 3 weeks (Claerhout et al. 2004). History of contact lens use, ocular trauma, or unsuccessful treatments for other disorders such as herpes simplex virus and fungal infections should suggest the possibility of AK (Bacon et al. 1993; Sharma et al. 2000; Sun et al. 2006). Thus, laboratory diagnosis is necessary to confirm the infection. Culture of corneal scrapings is the gold standard for definitive diagnosis of AK (Schuster and Visvesvara 2004) and is also simple and of low cost. However, culture results can take 1 to 10 days,

✉ Adriana Oliveira Costa
adrincosta@gmail.com

¹ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

² Departamento de Patologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

³ Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

⁴ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

delaying initiation of adequate treatment (Khairnar et al. 2011). Besides, its sensitivity is not high, being reported to range from 7% (Yera et al. 2007) to 57% (Dart et al. 2009).

Polymerase chain reaction-based methods can provide a rapid and sensitive mean of detecting *Acanthamoeba* in corneal scrapings compared to microbiological and culture methods (Schroeder et al. 2001; Yera et al. 2007; Dhivya et al. 2007; Khairnar et al. 2011). Studies have reported limits of detection of five trophozoites (Khan 2001) and one trophozoite (Schroeder et al. 2001) for PCR using regions of the 18S-rRNA gene as a target. Semi-nested PCR (snPCR) developed by Dhivya et al. (2007) has shown higher sensitivity than uniplex PCR. However, strategies for efficient DNA extraction are needed to avoid false negative results, especially for encysted forms of *Acanthamoeba* also found in corneal tissue, which are particularly resistant to DNA-extraction procedures validated for other microorganisms (Goldschmidt et al. 2008).

This study aimed to evaluate a protocol for molecular detection of *Acanthamoeba* in samples of cornea for the diagnosis of AK. Initially, two DNA extraction techniques along with snPCR described by Dhivya et al. (2007) were tested for detection of trophozoites and cysts from cultures. The most effective protocol was evaluated in corneal samples from experimentally infected rats and subsequently applied to diagnose presumptive cases of AK.

Materials and methods

Sample preparation

Trophozoites of an *Acanthamoeba polyphaga* strain (ATCC 30461) cultured at 30 °C in proteose peptone-yeast extract-glucose (PYG) medium (Visvesvara and Balamuth 1975) were used in the experiments. Cysts were obtained after incubating trophozoites in Neff saline (Neff et al. 1964) for 72 h at 30 °C.

Trophozoites and cysts were quantified in a Neubauer counting chamber, and microtubes containing 50 µL of ultrapure water were inoculated with 1, 5, 10, or 100 cells, in triplicate. Lower quantities (1, 5, and 10) were prepared by microscopic examination of drops of 3–5 µL of diluted suspension on a microscope slide. After identifying the desired quantities, the drop was aspirated and transferred to the microtube. Drops without trophozoites or cysts were also transferred to microtubes to be used as negative controls.

DNA extraction methods

Two protocols of DNA extraction were tested: (1) alkaline lysis and precipitation with ammonium acetate, based on a technique used for DNA extraction of *Entamoeba histolytica*

cysts in feces (Vianna et al. 2009), and (2) a method using the ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen), which is based on DNA binding to magnetic beads.

In the alkaline lysis method, 200 µL of lysis buffer (50 mM glucose, 25 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA) and 400 µL of 0.2 mM NaOH with 1% SDS were added to the sample and subjected to seven freeze/thaw cycles (5 min in liquid nitrogen and 5 min at 99 °C). After addition of 300 µL of 7.5 mM ammonium acetate, samples were homogenized and centrifuged at 10,000×g for 5 min. About 700 µL of the supernatant was transferred to a microtube, and 500 µL of isopropanol was added. The mixture was gently homogenized, incubated at –20 °C for 15 min, and centrifuged at 10,000×g for 15 min. The supernatant was discarded and the pellet washed in 70% ethanol. After drying the pellet at ambient temperature, DNA was re-suspended with 25 µL ultrapure water.

For the DNA extraction using the kit, samples were subjected to seven freeze/thaw cycles (5 min in liquid nitrogen and 2 min at 37 °C) in 500 µL of lysis buffer provided in the kit. The subsequent steps of extraction were performed as recommended by the manufacturer's protocol.

DNA samples from microorganisms known to cause corneal infection were also used to evaluate specificity (*Candida albicans*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, Herpes simplex virus type 1).

Amplification reactions

Briefly, the first round of PCR used the primers JDP1 and JDP2 (Schroeder et al. 2001) in reactions performed on a final volume of 15 µL with 4 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.6 mg/µL bovine serum albumin (BSA), 0.5 µM of each primer, 0.6 U of Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), and 5 µL of DNA. The amplification profile was 94 °C for 7 min, 72 °C for 1 min, 25 cycles at 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min followed by a final extension step of 72 °C for 10 min. The snPCR was performed as described by Dhivya et al. (2007) with minor modifications. Two microliters of PCR product was used for the snPCR carried out on 15 µL of reaction containing 1.6 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5 µM of the inner forward primer A1 and the outer reverse primer JDP2, and 0.5 U of Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Amplification was performed at 95 °C for 5 min, followed by 20 cycles at 95, 64, and 72 °C for 45 s each and a final extension at 72 °C for 5 min. All amplification reactions were performed in a thermocycler Biocycler, MJ96 (Biosystems®). The products of snPCR were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide.

Experimental keratitis in rats

Six female Wistar rats approximately 60 days old were anesthetized with 60 mg/kg ketamine HCl (Vetanarcol®, König do Brasil, Brazil) and 7.5 mg/kg xylazine (Dopaser®, Calier, Spain) by intraperitoneal injection. The left eye was washed three times with sterilized saline solution and then anesthetized with topical 2% lidocaine. Intrastromal inoculation was performed with 2 µL of suspension containing 10⁵ trophozoites of the *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461 in Page's saline (2.5 mM NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 0.5 mM Na₂HPO₄, 40 mM CaCl₂, and 20 mM MgSO₄), using a microliter 30G needle, similar to the procedures of Ren and Wu (2010). Two animals were inoculated with Page's saline only as controls. Six days postinoculation, the lesions were evaluated and the rats euthanized with a double dose of anesthetic before performing corneal scrapings and biopsy. The lesions were graded as follows: Grade I, point of opacity limited to the region of inoculum, less than 1 mm in diameter; Grade II, point of opacity greater than 1 mm, clearly surpassing the initial point of inoculum, but not occupying the entire cornea; and Grade III, extensive damaged area, involving more than 50% of the cornea.

Detection of *Acanthamoeba* in rat corneal tissue

Each rat inoculated with *Acanthamoeba* was positioned under a stereomicroscope; the head was immobilized with tape, and the eye washed with sterilized saline. Using a #15 scalpel blade, the injured area of the cornea was scraped three times at paralleled sites at the lesion. Each corneal scraping was inoculated in (1) a tube with 2 mL of PYG medium, (2) a plate non-nutrient agar (NNA) with heated-inactivated *Escherichia coli*, and (3) a microtube containing 50 µL of Page's saline. The scalpel was flame-sterilized between each procedure. For biopsy, a 3-mm fragment of the cornea, incorporating both corneal infiltrate and adjacent clear cornea, was excised and removed with a fine tip tweezers to a sterilized lamina. The

fragment was separated into three parts for culture in PYG, culture in NNA, and inoculation in a microtube with Page's saline, as previously described for scrapings. Corneas inoculated only with Page's saline were submitted to the same procedures as controls. Cultures were incubated at 30 °C and examined from day 5 to day 20 following the seeding. Samples collected in the microtubes with 50 µL of Page's saline were stored at -20 °C until DNA extraction using ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen) and snPCR.

Diagnosis of human cases of *Acanthamoeba* keratitis

Ten presumptive human cases of AK admitted in Ophthalmology Sector of Cassiano Antônio de Moraes University Hospital, Vitória, Espírito Santo, Brazil, during the period of March 2010 and May 2012, were evaluated by culture and PCR/snPCR. Corneal samples were seeded in soy-agar plates with *Escherichia coli*, as described by Costa et al. (2010). A second scraping was transferred to microtubes with 200 µL de Page's saline and immediately transported to the laboratory for centrifugation at 5000×g by 5 min. About 150 µL of the supernatant was discarded and the microtube was stocked at -20 °C until performing DNA extraction, which was carried out with ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen).

Results

The snPCR has detected one trophozoite in two out of three repetitions using both DNA extraction methods (Table 1). When cysts were used for DNA extraction, positivity by snPCR was achieved with 100 forms treated by alkaline lysis extraction and 1 to 10 forms subjected to the commercial kit (although this did not occur in all repetitions) (Table 1). The samples made of ultrapure water (negative controls) and DNA samples obtained from fungi, bacteria, and virus (specificity controls) had a negative result in the tests.

Table 1 snPCR positivity for samples containing 1, 5, 10, and 100 *Acanthamoeba* trophozoites or cysts after DNA extraction by two different methods

Reaction	Forms	Alkaline lysis ^b				Extraction kit ^c			
		1	5	10	100	1	5	10	100
snPCR ^a	Trophozoites	++ -	++ -	+++	+++	++ -	++ -	+++	+++
	Cysts	---	---	---	+++	+ - -	++ -	++ -	+++

+ positive result, - negative result

^a snPCR targeting the ASA-S1 fragment of 18S rRNA (Dhivya et al. 2007) in triplicate samples

^b Extraction performed by freeze/thaw cycles in glucose-Tris-EDTA buffer containing NaOH and SDS, followed by precipitation in ammonium acetate

^c Extraction with the ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue (Invitrogen) after freeze/thaw cycles

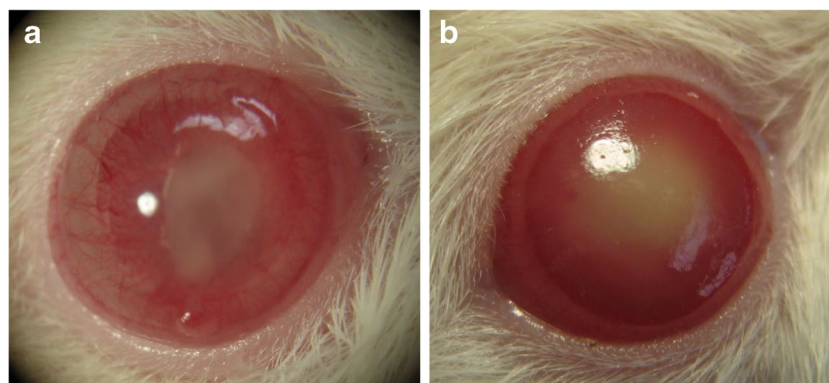


Fig. 1 *Acanthamoeba* keratitis induced in Wistar rats by intrastromal inoculation of 10^5 trophozoites of *A. polyphaga* strain ATCC 30461. Lesions were evaluated 5 days after the inoculation. Lesions classified

as grade II, with the point of opacity greater than 1 mm, clearly exceeding the initial point of inoculum (a) and grade III, showing an extensive damaged area and involvement of more than 50% of the cornea (b)

Keratitis induced in Wistar rats resulted in corneal lesions from grades I to III in all animals (Fig. 1, Table 2). Corneal inoculation with Page's saline resulted in no lesions. Table 2 outlines results of the cultures and snPCR, using corneal scraping or corneal biopsy from the animals. For corneal scraping samples, culture in PYG was negative, culture in NNA was positive in only one sample, and snPCR showed signs of amplification in all six samples. In corneal biopsy material, all six samples were positive in NNA cultures, while four samples were detected by culture in PYG. All corneal biopsy samples were positive for *Acanthamoeba* by snPCR. Samples from rat cornea inoculated with Page's saline were negative in all diagnostic methods.

Four out of ten corneal scrapings of presumptive cases of *Acanthamoeba* keratitis were positive in culture method and eight were positive in snPCR (Table 3).

Discussion

In recent years, both conventional PCR and real-time PCR have been reported to be efficient techniques to detect *Acanthamoeba* in corneal tissue (Thompson et al. 2008; Khairnar et al. 2011; Laummaunwai et al. 2012). Conventional PCR is widespread, and lower cost equipments and reagents have recently become available. However, limitations such as the low number of amoebae in the corneal scrapings and the greater resistance of cysts to extraction and release of DNA must be considered in establishing a protocol using molecular techniques. In the present study, we have evaluated a DNA extraction method that was efficient to detect one trophozoite and one cyst in snPCR. We have also validated it in corneal samples of animal and, subsequently, in human scrapings.

Table 2 Results of culture and snPCR for corneal scraping and corneal biopsy of Wistar rats with experimentally induced *Acanthamoeba* keratitis

Animal	Lesion grade ^a	Corneal scraping			Corneal biopsy		
		Culture NNA ^b	Culture PYG ^c	snPCR ^d	Culture NNA ^b	Culture PYG ^c	snPCR ^d
1	II	+	–	+	+	–	+
2	I	–	–	+	+	+	+
3	II	–	–	+	+	+	+
4	III	–	–	+	+	+	+
5	III	–	–	+	+	+	+
6	III	–	–	+	+	+	+
Rate	NA	1/6 (16.7%)	0/6 (0%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)	5/6 (83.3%)	6/6 (100%)

NA not applicable, + positivity, – negativity

^a Lesion evaluated 5 days after inoculation, as follows: Grade I, point of opacity limited to the region of inoculum, less than 1 mm in diameter; Grade II, point of opacity greater than 1 mm, clearly surpassing the initial point of inoculum, but not occupying the entire cornea; Grade III, extensive damaged area, involvement of more than 75% of the cornea

^b Culture in non-nutrient agar with *Escherichia coli* heat-inactivated

^c Culture in proteose-peptone-yeast extract medium (Visvesvara and Balamuth, 1975). Positivity observed after 10 days of incubation

^d snPCR targeting the ASA-S1 fragment of 18S rRNA (Dhivya et al. 2007)

Table 3 Results of culture and snPCR for corneal scraping from patients with clinical signs of *Acanthamoeba* keratitis

Sample number	Corneal scraping	
	Culture ^a	snPCR ^b
1	–	+
2	+	+
3	–	+
4	+	+
5	+	+
6	–	+
7	–	+
8	+	+
9	–	–
10	–	–
Total	4/10	8/10

+ positivity, – negativity

^a Culture in soy-agar with *Escherichia coli* (Costa et al. 2010)^b snPCR targeting the ASA-S1 fragment of 18S rRNA (Dhivya et al. 2007)

Trophozoites and cysts from cultures were used in the initial experiments to determine an efficient DNA extraction technique, including the evaluation of a protocol of alkaline lysis to obtain DNA from *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in feces (Vianna et al. 2009). The protocol was adapted and tested on the assumption that lysis with NaOH could facilitate breaking the cyst wall and releasing the DNA from cysts. The method seems to be relatively efficient for trophozoites, since two out of three repetitions using one and five cells resulted in positivity with snPCR. However, no sign of amplification was observed in snPCR when 10 or fewer cysts were used. These results confirmed the already known resistance of *Acanthamoeba* cysts to DNA extraction, which seems to be related to the resistance of the cyst wall as well as the presence of high-density bodies in the cyst nucleus. These bodies are consisted of core protein condensed by genetic material that can interfere with the DNA denaturation (Goldschmidt et al. 2008; Lasman 1977).

When the extraction kit was used, it was possible to detect 1, 5, and 10 trophozoites or cysts by snPCR in one or more of the triplicate samples. A possible explanation for the higher efficiency of the kit is the use of proteinase K, which could increase the DNA available for the binding to primers and for polymerase action (Goldschmidt et al. 2008). The possibility of false-positive detection as a result of contamination (amplicons) was prevented by careful handling during the procedures and monitoring with control samples, which were all negative.

To obtain corneal scrapings and biopsy for evaluating the molecular technique and to compare it to culture methods, *Acanthamoeba* keratitis was induced in a rat model. The

intrastromal inoculation resulted in lesions of variable grades in all the six animals tested. Although intrastromal inoculation did not replicate the most frequent source of contamination in humans, it provided a higher infection rate, compared to procedures like corneal scratching and the wearing of contaminated contact lenses (Ren and Wu 2010). Thus, the rat model for keratitis could be a good alternative for testing diagnostic procedures applicable to human patients.

Culture in agar plates with *Escherichia coli* is the usual method of diagnosis of *Acanthamoeba* in corneal samples (Siddiqui and Khan 2012). In this study, this method was compared to seeding in PYG medium and seemed to be slightly superior for diagnostic purposes. As the agar plate method is simpler and uses a lower number of components, it was considered the best choice in terms cost-benefit. Furthermore, the higher number of nutrients in PYG could, in some instances, stimulate the growth of organisms other than *Acanthamoeba* in coinfection cases, masking the results.

Comparing the corneal materials, biopsy was clearly superior to corneal scraping regarding the positivity in culture, which can be explained by the higher number of parasites obtained in biopsy. It is known that biopsy is the indicated procedure in cases when the microbial agent is located in deeper layers of the cornea or when corneal scrapings are repeatedly negative, since scraping can be insufficient for the isolation (Younger et al. 2012). However, corneal scraping is the chosen procedure in suspected cases of amoebic keratitis, since it is less invasive and easier to perform. In this study, the snPCR was efficient to detect *Acanthamoeba* in corneal scraping in the animal model, showing that a small amount of tissue can be a limitation for culturing, but not for snPCR. Evaluation of human corneal scrapings for diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis also confirmed this point. The human samples that were negative in snPCR were also negative in the culture, suggesting that these keratitis cases should be caused by other causes rather than *Acanthamoeba*. Indeed, empiric treatment for *Acanthamoeba* did not result in improvement of the symptoms, and other causes were then attributed for these cases (data not shown).

In conclusion, DNA extraction with Charge Switch® Kit after freeze/thaw process and amplification by snPCR presented here was efficient to detect the low quantities of trophozoites and cysts that may be present in corneal scrapings. The use of the technique in corneal samples of infected animals and its validation to diagnose human-suspected cases indicated that this is a good alternative for diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis.

Acknowledgements The authors thank CNPq, Fundação Araucária, and PRPq/UFGM for financial support. We also thank Ophthalmology Sector staff from Cassiano Antônio de Moraes University Hospital for providing the human corneal scrapings used in this study.

Compliance with ethical standards All procedures with animal were conducted under accepted guidelines for the care and use of laboratory animals for research and approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the Biological Sciences Sector of Federal University of Paraná, Brazil, protocol number 420b.

The use of information on the diagnosis of patients suspected of *Acanthamoeba* keratitis was approved by the Ethical Committee of Health Sciences Center of Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil (protocol number 006/07), and followed the tenets of Declaration of Helsinki.

References

- Bacon AS, Frazer DG, Dart JKG, Matheson M, Ficker LA, Wright P (1993) A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984–1992. *Eye* 7:719–725. doi:10.1038/eye.1993.168
- Claerhout I, Goegebuer A, Van Den Broecke C, Kestelyn P (2004) Delay in diagnosis and outcome of *Acanthamoeba* keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242:648–653. doi:10.1007/s00417-003-0805-7
- Costa AO, Castro EA, Ferreira GA, Furst C, Crozeta MA, Thomaz-Soccol V (2010) Characterization of *Acanthamoeba* isolates from dust of a public hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. *J Eukaryot Microbiol* 57:70–75. doi:10.1111/j.1550-7408.2009.00453.x
- Dart JKG, Saw VPJ, Kilvington S (2009) *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *Am J Ophthalmol* 148:487–499.e2. doi:10.1016/j.ajo.2009.06.009
- Dhivya S, Madhavan HN, Rao CM, Ramchander PV, Therese KL, Malathi J (2007) Comparison of a novel semi-nested polymerase chain reaction (PCR) with a uniplex PCR for the detection of *Acanthamoeba* genome in corneal scrapings. *Parasitol Res* 100:1303–1309. doi:10.1007/s00436-006-0413-7
- Goldschmidt P, Degorge S, Saint-Jean C, Yera H, Zekhnini F, Batellier L, Laroche L, Chaumeil C (2008) Resistance of *Acanthamoeba* to classic DNA extraction methods used for the diagnosis of corneal infections. *Br J Ophthalmol* 92:112–115. doi:10.1136/bjo.2007.125898
- Khaimar K, Tamber GS, Ralevski F, Pilla DR (2011) Comparison of molecular diagnostic methods for the detection of *Acanthamoeba* spp. from clinical specimens submitted for keratitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70:499–506. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.03.019
- Khan NA (2001) Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol* 43:391–395. doi:10.1007/s002840010325
- Lasman M (1977) Light and electron microscopic observations on encystment of *Acanthamoeba palestinensis*, Reich. *J Protozool* 24:244–248
- Laummaunwai P, Ruangjirachupom W, Boonmars T (2012) A simple PCR condition for detection of a single cyst of *Acanthamoeba* species. *Parasitol Res* 110:1569–1572. doi:10.1007/s00436-011-2662-3
- Marciano-Cabral F, Cabral G (2003) *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 16:273–307. doi:10.1128/CMR.16.2.273-307.2003
- Maycock NJR, Jayaswal R, Ed F (2016) Update on *Acanthamoeba* Keratitis: diagnosis, treatment and outcomes. *Cornea* 35:713–720. doi:10.1097/ICO.0000000000000804
- Neff R, Ray S, Benton W, Wilborn M (1964) Induction of synchronous encystment (differentiation) in *Acanthamoeba* sp. *Methods Cell Physiol* 55–83
- Radford CF, Minassian DC, Dart JKG (2002) *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *Br J Ophthalmol* 86:536–542
- Ren M, Wu X (2010) Evaluation of three different methods to establish animal models of *Acanthamoeba* keratitis. *Yonsei Med J* 51:121–127. doi:10.3349/ymj.2010.51.1.121
- Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ (2001) 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* 39:1903–1911. doi:10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001
- Schuster FL, Visvesvara GS (2004) Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet Parasitol* 126:91–120. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.019
- Sharma S, Garg P, Rao GN (2000) Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol* 84:1103–1108
- Siddiqui, Khan (2012) Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors* 2012 5:6. doi:10.1186/1756-3305-5-6
- Sun X, Zhang Y, Li R, Wang Z, Luo S, Gao M, Deng S, Chen W, Jin X (2006) *Acanthamoeba* keratitis: clinical characteristics and management. *Ophthalmology* 113:412–416. doi:10.1016/j.optha.2005.10.041
- Thompson PP, Kowalski RP, Shanks RMQ, Gordon YJ (2008) Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *J Clin Microbiol* 46:3232–3236. doi:10.1128/JCM.00908-08
- Vianna EN, Costa JO, Santos CKS, Cury MC, Silva EF, Costa AO, Gomes MA (2009) An alternative method for DNA extraction and PCR identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in fecal samples. *Parasitology* 136:765. doi:10.1017/S0031182009006167
- Visvesvara GS, Balamuth W (1975) Comparative studies on related free-living and pathogenic amebae with special reference to *Acanthamoeba*. *J Protozool* 22:245–256
- Yera H, Zamfir O, Bourcier T, Viscogliosi E, Noel C, Dupouy-Camet J, Chaumeil C (2007) Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of *Acanthamoeba* isolates from ocular infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26:221–224. doi:10.1007/s10096-007-0268-6
- Younger JR, Johnson RD, Holland GN, Page JP, Nepomuceno RL, Glasgow BJ, Aldave AJ, Yu F, Litak J, Mondino BJ, UCLA Cornea Service (2012) Microbiologic and histopathologic assessment of corneal biopsies in the evaluation of microbial keratitis. *Am J Ophthalmol* 154:512–519.e2. doi:10.1016/j.ajo.2012.03.014

Secreted proteases from *Acanthamoeba* of four distinct genotypes in long-term axenic culture and after interaction with MDCK cells

Cecília C. S. Ferreira^a, Elaine I. S. Mesquita^a, Cinthia Furst^b, Cynara O. Possamai^b, Isabela Aurora Rodrigues^a, Jonathas Santos Abrahão^c, Ludmila Karen^c, Marina Grossi^a, Carlos Alberto Tagliati^a, Adriana O. Costa^{a,*}

^a Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Patologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

^c Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

* Corresponding author: adrincosta@gmail.com

ABSTRACT

The free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba* are the causative agents of severe infections in humans, as *Acanthamoeba* keratitis and amoebic encephalitis and. The ability to produce proteases is one of the factors involved in the pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. The aim of this study was to evaluate secreted proteases of six *Acanthamoeba* strains from distinct genotypes (T1, T2, T4 and T11) maintained in long-term axenic culture and subjected to three successive passages in MDCK cells. Conditioned medium was obtained from cultures before and after MDCK interaction, resolved in SDS-PAGE containing gelatin and subjected to azocasein quantitative assays. Zymography profiles varied among the strains, with three main proteases of serine type from 49 to 128 kDa. T1 genotype strain, isolated from environmental dust, showed quantitatively higher production of proteases than the others. No change in zymography profiles of MDCK interacted cultures was detected in relation to long-term samples. Two strains presented lower proteolytic activity in post-interacted condition, while the remaining strains presented similar values before and after MDCK passages. In conclusion, this study confirmed the predominance of serine type in *Acanthamoeba* secreted proteases, which showed distinct profiles among the strains and genotypes evaluated presently. Also, MDCK passages was not able to modify the zymography patterns,

Keywords: *Acanthamoeba*, pathogenicity, proteases, CPE

1. INTRODUCTION

The amoebae of the genus *Acanthamoeba* are free-living organisms ubiquitously distributed in nature and in frequent contact with humans. Although in most cases this contact is innocuous, *Acanthamoeba* species can eventually cause potentially blinding or fatal infections. A painful, progressive corneal disease caused by *Acanthamoeba* is denominated *Acanthamoeba* keratitis (AK) and is generally associated to contact lens use, particularly due to poor hygiene or exposure to amoebas while swimming or showering with lens (Page and Mathers, 2013). Other clinical presentations of acanthamoebiasis are skin lesions and lung infections that progress to involvement of central nervous system, culminating in granulomatous amebic encephalitis (GAE). GAE is a severe disease with high mortality rate (more than 90%) that occurs predominantly in patients presenting chronic or immunosuppressive diseases (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Khan, 2009).

Proteases are considered an important virulence factor of many pathogens, including *Acanthamoeba* (Khan, 2006). The adhesion to host cells through glycoprotein-lectin interaction constitutes the first step in AK, followed by proteases secretion and cytopathic effect (Hurt et al, 2003; Clarke e Niederkorn, 2006). In GAE, proteases have an important role in the blood–brain barrier disruption (Alsam et al., 2005). *Acanthamoeba* can produce predominantly serine proteases, but also cysteine and metalloproteases, which present variable patterns among distinct isolates (Alfieri et al., 2000; Khan et al., 2000; Serrano-Luna e al., 2006; Khan, 2006). Some evidences indicate that clinical isolates release higher quantities of extracellular proteases than environmental isolates (Khan et., 2000; Kim et al., 2006; Lorenzo-Morales et al., 2015). A study of Koeshler et al. (2009) demonstrated that a strain associated to culture cells presented higher activity of proteases than the correspondent culture in prolonged axenic condition. Other report indicated that the production of a serine protease designed MIP133 is stimulated after amoeba contact with *Corynebacterium xerosis*, a mannose-rich bacteria from ocular flora (Alizadeh et al., 2005). Thus, factors related to the host seem to be involved in the modulation of proteases released by *Acanthamoeba*.

Among the 20 genotypes of *Acanthamoeba* that have been identified (T1 to T20) (Stodhart et al.,1998; Nupraset el al., 2010, Corsaro et al., 2015), T4 genotype is the most commonly associated with GAE and AK (Maciver et al., 2013). Most of previous works that focused proteases characterization have evaluated strains that belong to genotype T4 (Khan et al., 2002; Hurt et al., 2003; Koehsler et al., 2009, Mahdavi et al., 2017). Proteases characterization of other genotypes rather than T4 has been rarely described. Thus, the proposal of this study is to compare qualitative and quantitative profiles of secreted proteases of five *Acanthamoeba* strains of distinct genotypes (T1, T2, T4 and T11). Additionally, long-term culture and after interaction with MDCK monolayers were compared to evaluate if the contact of trophozoites with host cells can change the proteases profile.

2. METHODS

2.1 *Acanthamoeba* strains

Six *Acanthamoeba* strains belonging to the genotypes T1, T2, T4 and T11 were used. Two of them (LG and ALX) were isolated from AK cases and four (AP4, R2P5, AR14 and AR15) are from environmental origin. General details of the isolates, including characteristics associated to their pathogenicity, are outlined in **Table 1**. *Acanthamoeba* cultures were maintained axenically in PYG medium (20 g/L Proteose Peptone, 1 g/L yeast extract, 0.1 M glucose; 4 mM MgSO₄; 0.4 mM CaCl₂; 3.4 mM sodium citrate; 0.05 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ and 2.5 mM of each Na₂HPO₄ and KH₂PO₄) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and 20 µg/L enrofloxacin (Baytril, Bayer) at 32°C.

Table 1. Characteristics of *Acanthamoeba* strains evaluated in this study

Strain	Genotype	Origin	Osmo- and thermotolerance
AP4 ^a	T2	Water, Tuskegee, USA (ATCC 30872)	NE ^c
R2P5 ^b	T1	Domestic Dust, Vitória-ES, Brazil	No growth at 1M / 42° C
ALX ^a	T4	Clinical case of AK, Vitória-ES, Brazil	1 M / 42°C
LG ^a	T4	Clinical case of AK, Vitória-ES, Brazil	1 M / 37°C
AR14 ^a	T4	Domestic Dust, Vitória-ES, Brazil	1 M / 37°C
AR15 ^a	T11	Domestic Dust, Vitória-ES, Brazil	0.5 M / 37°C

a. Genotypic and physiological characterization described in Duarte et al., 2013

b. Genotypic and physiological characterization described in Possamai et al., 2018

c. Not evaluated

2.2 Co-culture with MDCK monolayers

Monolayers of the established line Madin Darby Canine Kidney (MDCK, ATCC CCL34) were grown in 24 well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), supplemented with

10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and antibiotics in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. *Acanthamoeba* trophozoites (10⁵) in exponential growth were interacted with the monolayers in a 2:1 ratio for 24 hours. Supernatant was collected and transferred to a new plate and incubated again in same conditions. This process was repeated one more time. After three interactions, the supernatant was collected and transferred to 25cm² flasks containing PYG medium. Conditioned medium was obtained as described below.

2.3 Conditioned medium

Trophozoites from long-term cultures and from MDCK-interacted cultures (10⁷ cells in exponential growth) were transferred to culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with a final volume of 5 mL of PYG medium without serum. The flasks were maintained at 32°C for 24 hours. The supernatant was collected and centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm. The supernatant was filtered in a 0.22 µm sterile membrane (Millex®, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and stored in – 80°C freezer.

2.4 Zymography assays

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels containing gelatin (1mg/mL) were used for zymography of conditioned medium from *Acanthamoeba* before and after interaction with MDCK cell monolayers, in procedures based on a protocol described previously (Alfieri et al., 2000). Briefly, 5 µL of conditioned medium was diluted (1:2) with electrophoresis sample loading buffer and applied to the gels. After electrophoresis, gels were soaked in 2% Triton X-100 solution for 60 minutes, incubated in developing buffer (50 mM Tris with 10 mM CaCl₂, pH 7.4) at 37°C overnight and stained with Coomassie Brilliant Blue. To partially classify the proteases, samples of conditioned medium were pretreated with phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM PMSF, a serine proteases inhibitor), and ethylenediamine tetra-acetic acid (10 mM EDTA, a metalloproteases inhibitor) for 30 minutes before the run.

2.5 Azocasein assay

Protease activity in conditioned medium was determined by a colorimetric method (Khan et al., 2000). Briefly, 50 µL of 2% azocasein was incubated with 25 µL of conditioned medium in pH 7.5 buffer for 3 hours. Reaction was stopped with 10% trichloroacetic acid (TCA). After 15 minutes the mixture was centrifuged at 13.500 rpm for 15 minutes. Supernatant was transferred to a 96 well plate containing 100 µL NaOH 1M and absorbance was determined at 440 nm. The values were converted to units of protease activity (U), as previously described (Alfieri et al., 2000). Samples of conditioned medium were also previously treated with protease inhibitors PMSF and EDTA as described above.

2.6. Statistical analysis

Data analysis was performed using SPSS 20.0 and Minitab 16.0. Two-way ANOVA was performed to evaluate the difference before and after interaction with MDCK cells. The differences between the isolates in the presence or absence of inhibitor were evaluated with Mann-Whitney test (not-Normal data) and paired t-test (Normal Data).

3 RESULTS

All long term culture of *Acanthamoeba* exhibited three main proteases and most of them presented a pattern comprised by one high molecular weight band between 118 kDa to 128 kDa and two smaller bands varying from 49 kDa to 65 kDa (**Figure 1**). AP4 was the only strain that presented two bands of high molecular weight (108 kDa and 123 kDa) and one smaller (53 kDa). Proteases from long-term cultures were inhibited by PMSF, but not by EDTA, suggesting serine proteases type. R2P5 expressed higher activity than other isolates, demanding 1:10 dilution to allow bands visually defined. Protease profile of cultures interacted with MDCK cells was similar to long-term cultures and all of them are also inhibited by PMSF, but not by EDTA, indicating they are supposedly serine proteases (**Figure 1**).

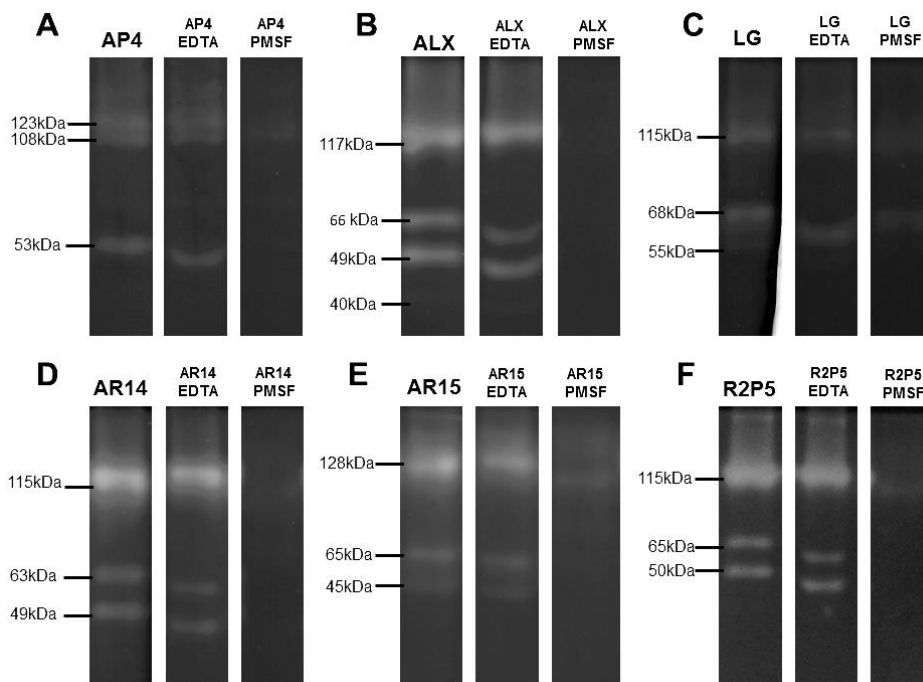


Figure 1. Proteolytic activity of conditioned medium from six *Acanthamoeba* isolates of clinical (C) and environmental (A, C, D, E) origin. Proteases were evaluated with azocasein assay using 10% SDS-PAGE gel copolymerized with gelatin 1mg/mL as substrate and inhibitors PMSF (1mM) and EDTA (10mM) were used to characterize the proteases as serine proteases or metalloproteases, respectively

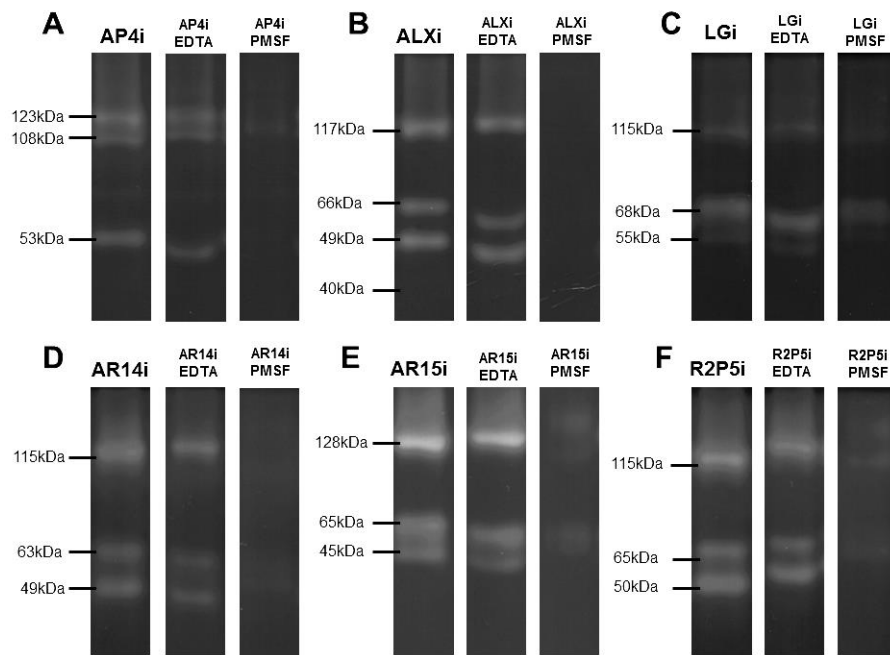


Figure 2. Proteolytic activity of conditioned medium of six *Acanthamoeba* isolates from clinical (B) and environmental (A, C, D, E) origin after interaction with MDCK cells. The MDCK cells and trophozoites were interacted for 24 hours in a 2:1 ratio, process that was repeated three times. The trophozoites were then collected and conditioned medium was obtained.

Among long-term cultures, the azocasein quantitative assay indicated that R2P5 had protease activity about two to four times higher than other strains (**Figure 3**). A significant inhibition by PMSF was observed in most of the strains ($p < 0.05$), while incubation with EDTA did not decrease the activity in any isolate.

After interaction with MDCK cells, ALX and R2P5 exhibited significantly lower activity than correspondent long-term cultures, while the remaining strains the activities before and after cell interaction were similar (**Figure 3**). When data of all strains were assessed together, the proteolytic activity after interaction was lower than that of long-term samples ($p < 0.05$).

A significant inhibition by PMSF was detected only in MDCK-interacted strains AR15 and ALX (**Figure 3**), but a grouped analysis (all isolates together) indicated a significant inhibition by PMSF ($p < 0.05$), in contrast to that observed with samples incubated with EDTA ($p < 0.05$).

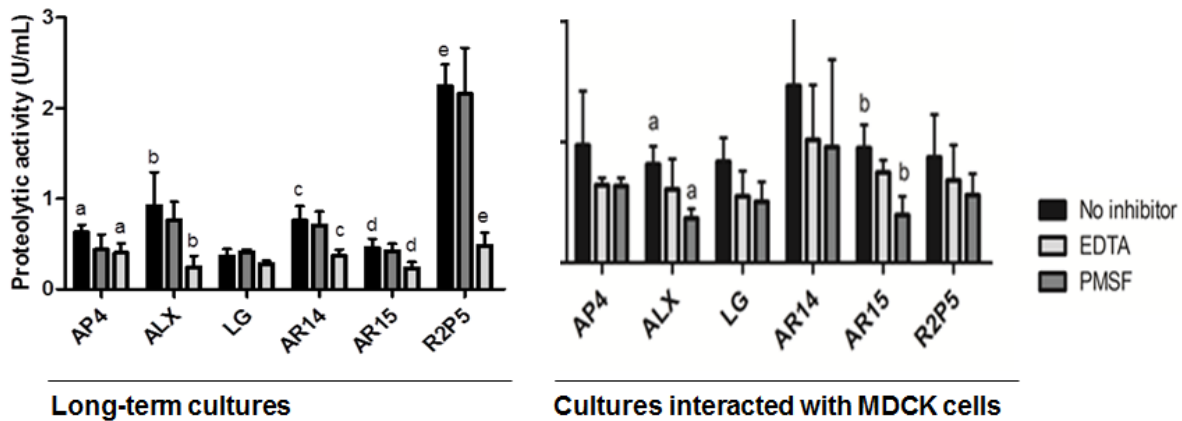


Figure 3. Quantification of proteolytic activity of conditioned medium obtained from six strains of *Acanthamoeba*. Activity was determined by azocasein colorimetric assay using samples from long-term cultures and cultures interacted with MDCK cells for 24 hours in a 2:1 ratio, for three times. Inhibitors PMSF (1 mM) and EDTA (10 mM) were also used. Asterisks indicated significant differences ($p < 0.05$) between values of proteolytic activity from samples before and after MDCK passages. Lower case letters indicated significant differences ($p < 0.05$) between samples without or with inhibitors.

4 DISCUSSION

All *Acanthamoeba* species, regarding their supposed pathogenicity, produce proteases as a biological process to degrade food in the environment (Khan, 2006). However, *Acanthamoeba* proteases have been indicated as an important determinant of pathogenicity, since clinical samples seems to produce proteases in higher quantities than those not related to infections (Khan et al., 2000, Khan, 2006; Koeshler et al., 2009). Several studies have focused *Acanthamoeba* proteases characterization, but most of them tested T4 genotype strains (Magliano et al., 2009, Mahdavi Poor et al., 2017) or used strains in which the genotype was not determined (Khan et al., 2000; Serrano-Luna et al., 2006; de Souza-Carvalho et al., 2010; Alves et al., 2012). In the present study, strains of clinical and environmental sources belonging to distinct genotypes were evaluated regarding the profile of secreted proteases.

Three main proteases were observed and partial characterization indicated serine proteases. Although proteases from some strains were not inhibited by PMSF in azocasein assay (e.g., long-term LG and MDCK-interacted LG and AP4), zymography indicated a clear inhibition, confirming this predominant type in the repertory of proteolytic enzymes described for *Acanthamoeba* (Khan et al., 2006; Serrano-Luna, 2006; Sissons et al., 2006; Dudley, Alsam, Khan, 2008). Protease of molecular weight near to 107 kDa, reported as a possible pathogenicity marker (Khan et al., 2000), was observed in all strains, including AP4 (T2) and AR15 (T11) considered of low pathogenicity (Duarte et al., 2013, da Rocha-Azevedo and Costa e Silva-Filho, 2007). Also, previous observation that pathogenic *Acanthamoeba* presents quantitatively higher protease activity (Khan et al., 2000; Mattana et al., 2002; Lorenzo-Morales et al., 2005) was not confirmed in the present experimental conditions, since AP4 and AR15 did not produce significantly fewer proteases than the supposedly pathogenic LG and ALX strains (genotype T4). These observations

confirmed, as previously mentioned by Serrano-Luna et al. (2006), the complexity of protease profiles among *Acanthamoeba* strains, making it difficult to determine a pathogenicity criterion in proteases assays. However, remarkable proteases activity seems to be a feature of some strains, as observed in R2P5 (genotype T1), in which the conditioned medium had to be diluted to visualize separated bands in zymography. This strain was isolated from an environmental source, is tolerant to 42° C and caused cytophatic effect in MDCK cells, suggesting higher pathogenicity (Possamai et al., 2018). The rare genotype T1 has been found in the nature only a few times (Lorenzo-Morales et al., 2005; Lorenzo-Morales et al., 2006; Huang e Hsu et al., 2010) and when detected in infections, it has been associated to GAE, but not to AK (Alsam et al., 2005; Booton et al., 2005; Sissons et al., 2006). The reasons for T1 strains ability to invade the brain but no other organs remain unknown (Booton et al., 2005'). Further experiments, such as in vivo assays to induce infection, could determine if the higher protease activity of R2P5 could be associated to a significant virulence, especially for causing GAE as previously reported by T1 genotype.

In several protozoan parasites, the loss of virulence properties due to long-term cultivation is a recognized event. Such properties can be restored after passages in host animal models, as observed for *Leishmania* (Katakura et al., 1985) and *Entamoeba histolytica* (Lushbaugh et al 1978). Also about *Acanthamoeba*, studies with this approach indicated higher virulence of cultures recovered from experimentally infected animals, compared to the correspondent long-term cultures (Mazur and Hadas, 1984; Verissimo et al., 2012). Moreover, other properties related to virulence, as encystment rate and protease activity tend to augment after in vitro interaction with culture cells, as demonstrated by a study with a genotype T4 strain interacted with HEp-2 cells (Koeshler et al, 2009). Presently, strains from distinct genotypes maintained in prolonged axenic cultivation were interacted with MDCK cells, similarly to Koeshler et al., to evaluate possible changes in secreted proteases profile and quantities. As observed in that previous work, the zymography profile of all strains did not change after cell interaction. However, the increase of extracellular protease activity in post-interacted trophozoites detected in Koeshler et al study was not observed presently, since two cell-interacted cultures exhibited lower protease activity compared to long-term ones (ALX and R2P5). The other strains presented similar activity before and after MDCK interaction. These contrasting results may be related to the type of cell used in the interaction (HEp-2 and MDCK). It is possible that HEp-2 passage could stimulate proteases production by mechanisms that were not triggered by MDCK cells. Indeed, recent findings have highlighted the contact-dependent mechanisms in cytophatic effect caused by *Acanthamoeba* trophozoites upon MDCK cells, suggesting that secreted proteases are not a strong determinant for cell destruction (Omaña-Molina et al., 2013; Flores-Maldonado et al., 2017). Thus, the decrease in proteolytic activity after MDCK passage could not necessarily be attributed to the interaction, but to a normal variation, which could be intrinsic to the strain. It is important to point out that secreted proteases can have distinct profile depending on the pH (Alfieri et al, 2000). We tested the proteolytic activity at pH 7.4, but distinct zymography profiles and proteolytic quantification can be observed in other pHs.

In summary, long-term cultures of *Acanthamoeba* from distinct genotypes presented serine proteases with a diverse profile at pH 7.4, which not change after passages in MDCK monolayers.

REFERENCES

- 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.; 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.
- 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.
- CLARKE, D.W.; NIEDERKORN, J.Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Parasitology.** v.22 n.4, p.175-180, 2006.
- CORSARO, D. & VENDITTI, D. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). **Parasitol. Res.** v.107, p. 233-238, 2010.
- DA ROCHA-AZEVEDO, B., AND COSTA E SILVA-FILHO, F. (2007). Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga*: analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. *Arch. Microbiol.* 188, 441-449. doi: 10.1007/s00203-007-0264-3. 2009
- DE 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.
- 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, Espirito Santo, Brazil. **Experim. Parasitol.** 135:9-14 . 2013.
- FLORES-MALDONADO C, GONZÁLEZ-ROBLES A, SALAZAR-VILLATORO L, OMAÑA-MOLINA M, GALLARDO JM, GONZÁLEZ-LÁZARO M, HERNÁNDEZ-RAMÍREZ VI, TALAMÁS-ROHANA P, LORENZO-MORALES J, MARTÍNEZ-PALOMO A. *Acanthamoeba* (T4) trophozoites cross the MDCK epithelium without cell damage but increase paracellular permeability and transepithelial resistance by modifying tight junction composition. *Exp Parasitol.* 2017 183:69-75.
- 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.
- Katakura K, Kobayashi A. Enhancement of infectivity of *Leishmania donovani* promastigotes by serial mouse passages. *J Parasitol.* 1985;71:393–394

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

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

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.; 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.

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.

KOESHLER, M.; LEITSCH, D.; DUCHENE, M.; NAGL, M.; WALOCHNIK, J. *Acanthamoeba castellanii*: growth on human cell layers reactivates attenuated properties after prolonged axenic culture. **FEMS Microbiol Lett.** v.299 n.2, p.121-127, 2009.

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.

LUSHBAUGH, W. B., A. KAIRALLA, C. B. LOADHOLT, AND F. E. PITTMAN. 1978. Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27:248.

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.

MAHDAVI POOR B, DALIMI A, GHAFARIFAR F, KHOSHZABAN F, ABDOLALIZADEH J. Characterization of extracellular proteases of *Acanthamoeba* genotype T4 isolated from different sources in Iran. *Parasitol Res.* 2017 116(12):3373-3380.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in Humans. *Clin. MICROBIOL. REV.* V.16 N.2, P.273-307, 2003.

MAZUR T, HADAS E 1994. The effect of the passages of *Acanthamoeba* strains through mice tissues on their virulence and its biochemical markers. *Parasitol Res* 80: 431-434.

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.

OMAÑA-MOLINA M¹, GONZÁLEZ-ROBLES A, ILIANA SALAZAR-VILLATORO L, LORENZO-MORALES J, CRISTÓBAL-RAMOS AR, HERNÁNDEZ-RAMÍREZ VI, TALAMÁS-ROHANA P, MÉNDEZ CRUZ AR, 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 Res Int.* 2013;2013:461329.

PAGE MA, MATHERS WD. 2013. *Acanthamoeba* keratitis: a 12-year experience covering a wide spectrum of presentations, diagnoses, and outcomes. J Ophthalmol. 2013;2013:670242. doi: 10.1155/2013/670242. Epub 2013 Jun 12.

REFERENCES

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.

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.

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.