

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

DÉBORA DA VITÓRIA DE MELO FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DOS
GENÓTIPOS T3, T4 E T5 DE *Acanthamoeba*
PROVENIENTES DE AMOSTRAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS**

**VITÓRIA
2018**

DÉBORA DA VITÓRIA DE MELO FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DOS
GENÓTIPOS T3, T4 E T5 DE *Acanthamoeba*
PROVENIENTES DE AMOSTRAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Área de Concentração: Parasitologia

Orientador: Dr. Aloísio Falqueto

Co-orientador (a): Dra. Cinthia Furst Leroy
Gomes Bueloni.

VITÓRIA

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

F363a Fernandes, Débora da Vitória de Melo, 1985 -
Avaliação da virulência de isolados dos genótipos T3, T4 E T5 de
Acanthamoeba provenientes de amostras clínicas e ambientais / Débora da
Vitória de Melo Fernandes – 2018.
102 f. : il.

Orientador: Aloísio Falqueto.

Coorientador: Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Virulência. 2. Acanthamoeba. 3. Doenças Transmissíveis. I. Falqueto,
Aloísio. II. Bueloni, Cinthia Furst Leroy Gomes. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



**PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO**

A mestranda **Débora da Vitória de Melo Fernandes** apresentou a dissertação intitulada **“AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DOS GENÓTIPOS T3, T4 E T5 DE *Acanthamoeba* PROVENIENTES DE AMOSTRAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS”** em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu () **aprovar** () **reprovar** a dissertação habilitando a farmacêutica **DÉBORA DA VITÓRIA DE MELO FERNANDES** a obter o Grau de **MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS**.

Vitória, ES, 23 de março de 2018.


Prof.ª Dr.ª Blima Fux
(Membro Interno)


Prof. Dr. Gustavo Rocha Leite
(Membro Externo)


Prof. Dr. Aloisio Falqueto
(Orientador)

DEDICATÓRIA

A Deus, meu grande Rei
por tudo o que Ele é e sempre será em minha vida.

EPÍGRAFE

*“Mas para mim, bom é aproximar-me de Deus; pus a minha confiança no Senhor
Deus, para anunciar todas as tuas obras”.*

Salmos 73:28

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, porque Ele me guiou os passos até aqui, me dando alívio a alma e esperança para todas as coisas.

Agradeço ao meu esposo, Alysson, por todo o apoio incondicional, pelas palavras de afeto e motivação, por caminhar comigo e me ajudar em todos os pequenos detalhes, que no final, foram fundamentais e determinantes para a realização desse mestrado.

Agradeço à minha mãe, Delma, por sempre se mostrar animada e feliz com as minhas conquistas e ao meu irmão, Daniel, porque sempre me foi referência em capacidade intelectual, bondade e doação ao próximo.

Agradeço aos meus sogros Inês e Geraldo, por acreditarem em mim.

Agradeço ao Prof. Dr. Aloísio Falqueto, pela sua nobreza, pela humildade e por todo o apoio a minha permanência no PPGDI e a co-orientadora Prof^a. Dr^a. Cinthia Furst que me recebeu novamente de braços abertos, me confiou uma pesquisa ampla sem questionar em nenhum momento a minha capacidade para tal fim.

Agradeço aos amigos que fiz no Núcleo de Estudos em Protozoologia, Cynara, Guilherme, Maressa e Diógenes, que em todos os momentos foram suporte, companheirismo, alegria, apoio e me ensinaram muito mais do que métodos científicos, me ensinaram que com paciência, perseverança, firmeza e determinação podemos realizar grandes feitos, me ensinaram que podemos superar qualquer obstáculo sem duvidar de si mesmo, mantendo o sorriso no rosto.

Agradeço aos técnicos do departamento Steeven, Rodrigo e Luciana, pois sempre se mostraram dispostos a me ensinar, dando gentilmente todo o apoio técnico para que o projeto pudesse ser executado.

Agradeço aos (as) amigos (as) da turma de mestrado Maralisi, Sabrina, Rhayanne, Rafael, Mariana e Karina, por terem compartilhado todas as emoções comigo, por

serem o ombro amigo quando eu precisei e serem a mão que eu careci nos momentos em que eu necessitei concluir algumas etapas, sem eles esse mestrado não teria sido o mesmo.

Agradeço a minha amiga e irmã em Cristo Érica, pois esteve ao meu lado me socorrendo e me apoiando, pela sua empatia, sabedoria e gentileza e por ser umas das minhas referências em capacidade técnica.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Adriana Oliveira Costa, Cecília e demais colaboradores da UFMG, por se mostrarem disponíveis e pacientes para o bom entendimento de algumas partes desse projeto.

Agradeço ao Prof^o Gustavo, pela disponibilidade e gentileza em tirar dúvidas sobre metodologias em estatística.

Agradeço aos meus companheiros de trabalho da PMES, pela compreensão, por toda a ajuda e confiança e por terem sido motivadores, além de bons ouvintes.

Agradeço a minha amiga Marcieli e ao meu amigo Leandro, por terem me motivado, pela preocupação, por cada palavra de apoio e pelo suporte na manutenção do meu equilíbrio emocional em todas as fases desse projeto, sobretudo nas mais difíceis.

Agradeço a instituição UFES por se fazer presente em minha formação acadêmica desde a graduação, possibilitando tanto o meu crescimento profissional quanto pessoal.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas (PPGDI), na pessoa do Prof. Dr. Moisés Palaci, pelo privilégio e pela oportunidade de poder realizar este trabalho e também a secretária do programa, Thamires, pelo bom trato com os alunos e ser um elo tranquilizador.

Agradeço a FAPES por possibilitar recursos para que essa pesquisa fosse realizada.

RESUMO

O gênero *Acanthamoeba* compreende protozoários que estão amplamente distribuídos nos mais diversos ambientes e por todos os continentes e que são capazes de causar infecções em seres humanos, como a ceratite e a encefalite granulomatosa. A patogênese da *Acanthamoeba* constitui-se de um processo multifatorial, com fatores que envolvem tanto a ameba quanto o hospedeiro, porém, esse mecanismo de patogenicidade ainda não está totalmente elucidado. O Objetivo desse trabalho foi identificar a virulência de seis isolados de origens clínica e ambiental de *Acanthamoeba*, com três genótipos diferentes, T3, T4 e T5 – representando os 20 tipos atualmente descobertos, e com duas doses de amebas sobre três tipos diferentes de linhagens celulares de mamíferos, MDCK, VERO e CHO, para testes de efeito citotóxico e de efeito citopático. Amostras clínicas provenientes de cultura de raspados de córnea de pacientes com diagnóstico de ceratite amebiana e as amostras ambientais procedentes de saída de torneira, de água de inundação e de poeira, foram coletadas e axenizadas entre os anos de 2014 a 2017. Considerando que o cultivo prolongado de isolados de *Acanthamoeba* pode provocar a diminuição ou possível perda da virulência, foi realizada a passagem das amebas em linhagem celular do tipo MDCK para reativar a virulência dos isolados em cultivo prolongado. O efeito citotóxico demonstrou que existe diferença de resultados a depender da linhagem celular utilizada, mas não dos isolados. A passagem em linhagem celular MDCK foi capaz de provocar o aumento da virulência dos isolados Mnus4 (T3-ambiental), Krt15.DFNL (T3-clínico), Krt12.ROS (T4-clínico) e Krt16.PEN (T5-clínico) nos testes de citotoxicidade. Nossos resultados demonstraram que a linhagem celular mais susceptível ao meio condicionado (efeito citotóxico) foi a MDCK, seguida de VERO e CHO. Entretanto, para o ensaio de citopatogenicidade, CHO foi a mais susceptível a exposição aos trofozoítos de *Acanthamoeba*, seguida de VERO e MDCK. No efeito citopático, os resultados variaram de acordo com o isolado utilizado, com a dose utilizada de trofozoítos e com a passagem em linhagem celular. O aumento do número de trofozoítos de ameba em incubação com as linhagens celulares foi capaz de provocar um aumento na virulência dos isolados dos três genótipos no teste de efeito citopático, sobre, principalmente, as linhagens VERO e CHO. No teste de efeito citopático, o genótipo mais virulento foi o T5, seguido de T4 e T3, sendo o isolado mais virulento o A3P4 (T5) de origem ambiental. Dessa forma, conclui-se que os resultados obtidos com os testes de efeito citopático e citotóxico com as diferentes linhagens de células de mamífero têm variações relacionadas ao tipo de linhagem celular de mamífero utilizada, bem como com as características inerentes de cada isolado. Assim, os resultados aqui obtidos poderão ser auxiliares para o planejamento de futuras pesquisas relacionadas aos estudos da patogenicidade da *Acanthamoeba*.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*, Isolado clínico, isolado ambiental, efeito citotóxico, efeito citopático, MDCK, VERO, CHO

ABSTRACT

The genus *Acanthamoeba* comprises protozoa that are widely distributed in diverse environments and across all continents and that are capable of causing infections in humans, such as keratitis and granulomatous encephalitis. The pathogenesis of *Acanthamoeba* constitutes a multifactorial process, with factors that involve both amoeba and host, but this mechanism of pathogenicity is not yet fully elucidated. There is little standardization in the methodologies applied here, with variable protocols in the literature. The objective of this work was to identify the virulence variations of six isolates of *Acanthamoeba*, from clinical and environmental backgrounds, with three different genotypes, T3, T4 and T5 - representing the 20 types of findings, and with two doses of amoebae on three types different from mammalian cell lines, MDCK, VERO and CHO, using cytotoxic effect and cytopathic effect methodologies. Clinical samples are obtained from cultured corneal scrapings of patients diagnosed with amoebic keratitis, and as environmental samples are obtained from faucet outlet, flood water and dust, collected and axenized between the years 2014 and 2017. Considering that prolonged cultivation of *Acanthamoeba* isolates may cause a decrease or loss of virulence of the amoeba, we use the passage of the amoebae in MDCK cell line to reactivate the virulence of the isolates in prolonged culture. Our data demonstrated that a cell line more susceptible to conditioned medium (cytotoxic effect) was MDCK, followed by VERO and CHO. However, for the cytopathogenicity assay, CHO was one more susceptible to exposure to *Acanthamoeba* trophozoites, followed VERO and MDCK. In the cytopathic effect, the results varied according to the isolate used, the dose used of trophozoites and the passage in cell line. The increase in the number of amoeba trophozoites in incubation with the cell lines was able to provoke an increase in the virulence of the isolates of the three genotypes in the cytopathic effect test, especially the VERO and CHO lines. In the cytopathic effect test, the most virulent genotype was T5, followed by T4 and T3, the most virulent isolate was A3P4 (T5) of environmental origin. Thus, it is concluded that the results obtained with the cytopathic and cytotoxic effect tests with the different mammalian cell lines have variations related to the type of mammalian cell line used, as well as the inherent characteristics of each isolate. Therefore, the results obtained here may be useful for the planning of future research related to the pathogenicity studies of *Acanthamoeba*.

Key words: *Acanthamoeba*, clinical isolate, environmental isolate, cytotoxic effect, cytopathic effect, MDCK, VERO, CHO

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1: Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> . Evidências de: nuc, núcleo; vac, vacúolos e actp, acantapódios. Escala da barra: 8 µm. Fonte: arquivo fotográfico da Coleção de <i>Acanthamoeba</i> do Laboratório de Protozoologia da UFE	21
Figura 2: Ciclo de vida da <i>Acanthamoeba</i> e principais vias de infecções. Escala da barra: 8 µm. Fonte: autora.	21
Figura 3: Cistos de <i>Acanthamoeba</i> com características típicas dos grupos morfológicos. A) Cisto de grupo morfológico I; B) Cisto de grupo morfológico II; C) Cisto de grupo morfológico III. Fonte: arquivo fotográfico da Coleção de <i>Acanthamoeba</i> do Laboratório de Protozoologia da UFES.	23
Figura 4: Mecanismo de patogenicidade de <i>Acanthamoeba</i> . Adaptado de: Khan, 2000, 2006.	30
Figura 5: Graus de efeito citopático sobre células do tipo VERO. (A) Controle de VERO. (B) Grau 1 de destruição, amostra Krt12.ROS. (C) Grau 2 de destruição, amostra A3P4. (D) Grau 3 de destruição, amostra A3P4. (Aumento de 10x).	56

LISTA DE GRÁFICOS

	PÁGINA
Gráfico 1: Efeito citotóxico dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> sobre linhagem celular MDCK antes e após a passagem em linhagem celular do tipo MDCK.	50
Gráfico 2: Efeito citotóxico dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> sobre linhagem celular VERO antes e após a passagem em linhagem celular do tipo MDCK.	51
Gráfico 3: Efeito citotóxico dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> sobre linhagem celular CHO antes e após a passagem em linhagem celular do tipo MDCK.	51
Gráfico 4: Box-plot do efeito citotóxico sobre a variável “linhagem”. A) antes da passagem dos trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> em linhagem celular MDCK ($p < 0,05$). B) após a passagem dos trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> em linhagem celular MDCK, com $p < 0,05$ para CHO e MDK, CHO e VERO, e $p > 0,05$ para MDCK e VERO.	52
Gráfico 5: Percentual de destruição celular pelo efeito citotóxico de isolados de <i>Acanthamoeba</i> antes e após a passagem em cultura celular. * $p < 0,05$.	53
Gráfico 6: Percentual de destruição celular pelo efeito citotóxico de isolados de <i>Acanthamoeba</i> de genótipos T3, T4 e T5 antes e após a passagem em cultura celular. * $p < 0,05$.	54
Gráfico 7: Percentual de destruição celular pelo efeito citotóxico de isolados de <i>Acanthamoeba</i> de origens ambiental e clínica antes e após a passagem em cultura celular. * $p < 0,05$.	54
Gráfico 8: Percentual de destruição celular das linhagens celulares pelo efeito citotóxico de isolados de <i>Acanthamoeba</i> antes e após a passagem em cultura celular. * $p < 0,05$.	55

LISTA DE QUADROS

	PÁGINA
Quadro 1: Relação dos genótipos e grupos morfológicos de <i>Acanthamoeba</i> e suas associações com doenças humanas.	29
Quadro 2: Tipos de metodologias empregadas nos testes de efeito citopático ou citotóxico de isolados de <i>Acanthamoeba</i> .	37
Quadro 3: Relação dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> que serão utilizados no estudo indicando o seu genótipo e procedência.	42
Quadro 4: Amostras de Linhagens de cultivo celular utilizadas no ensaio de citopatogenicidade de <i>Acanthamoeba</i> .	43
Quadro 5: Relação de efeito citopático de isolados de <i>Acanthamoeba</i> sobre linhagens celulares MDCK, VERO e CHO antes e após passagem em MDCK e com inóculos de tamanhos diferentes.	61
Quadro 6: Relação de susceptibilidade de linhagens celulares MDCK, VERO e CHO aos efeitos citotóxico e citopático de isolados de <i>Acanthamoeba</i> utilizando dois inóculos de trofozoítos (4×10^4 e 10×10^4 amebas por poço).	65

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1: Percentual do total de poços encontrados com cada grau de efeito citopático de isolados de <i>Acanthamoeba</i> , de acordo com o tamanho do inoculo de trofozoítos antes da passagem em linhagem celular MDCK.	58
Tabela 2: Percentual do total de poços encontrados com cada grau de efeito citopático de isolados de <i>Acanthamoeba</i> , de acordo com o tamanho do inoculo de trofozoítos após a passagem em linhagem celular MDCK.	59
Tabela 3: Percentual total de poços com variações em graus de efeito citopático de isolados de <i>Acanthamoeba</i> sobre linhagens celulares.	60
Tabela 4: Proporção da ocorrência de poços com maior e menor grau de efeito citopático entre isolados de <i>Acanthamoeba</i> antes e após a passagem em cultura de célula MDCK.	62
Tabela 5: Total de poços com grau 3 de efeito citopático de genótipos T3, T4 e T5 de <i>Acanthamoeba</i> .	63
Tabela 6: Total de poços com grau 3 de efeito citopático de amostras ambientais e clínicas de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i>	63
Tabela 7: Número de poços com efeito citopático sobre linhagens celulares MDCK, VERO e CHO.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Percentual
>	Maior que
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> , Coleção Americana de Culturas
AVL	Ameba de Vida Livre
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CA	Ceratite Amebiana
CHEC	<i>Chinese Hamster Corneal Epithelial Cells</i> , Célula do epitélio corneal de hamster chinês
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary Cells</i> , Célula de ovário de hamster chinês
cm³	Centímetros cúbicos
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Ácido Desoxiribonucléico
EAG	Encefalite Granulomatosa Amebiana
EC	Efeito Citopático
F-12	<i>Ham's F12 Nutrient Mixture</i> , Meio de cultura F-12 de Ham.
h	Horas
HBMEC	<i>Human Brain Microvascular Endothelial Cells</i> , células microvasculares cerebrais humanas endoteliais
HCE	<i>Human Corneal Epithelial Cell</i> , Célula epithelial corneana humana
HIV	<i>Human Immuno Deficiency Virus</i> , Vírus da Imunodeficiência Humana
kDa	Quilodalton

LDH	Lactato Desidrogenase
MBP	<i>Mannose-Binding Protein</i> , Proteína de Ligação de Manose
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney CellLine</i> , Linhagem Celular Originada de Células Renais de Cão
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
OCM1	<i>Ocular Human Uveal Melanoma Cell Line, Ocular Choroidal Melanoma-1</i>
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Tampão fosfato-salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHMB	Poli-hexametilenobiguanida
PYG	<i>Peptone, Yeast Extract and Glucose</i> , Peptona, Extrato de Levedura e Glicose
qsp	Quantidade suficiente para
rDNA	Ácido desoxiribonucléico ribossomal
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SBF	Soro Bovino Fetal
SNC	Sistema Nervoso Central
SSU	<i>Small subunit</i> , Subunidade menor
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
VERO	Célula de rim de macaco verde africano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 O GÊNERO <i>Acanthamoeba</i>	20
2.1.1 Classificação Morfológica	22
2.1.2 Classificação Genotípica	24
2.2 IMPORTÂNCIA MÉDICA	25
2.2.1 Infecções Causadas por <i>Acanthamoeba</i>.....	27
2.2.1.1 Ceratite Amebiana.....	27
2.2.1.2 Encefalite Granulomatosa Amebiana	27
2.2.2 Os diferentes genótipos de <i>Acanthamoeba</i> e sua associação com grupos morfológicos de doenças.....	28
2.3 PATOGÊNESE DE <i>Acanthamoeba</i>	29
2.4 TESTES COM MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE <i>Acanthamoeba</i>	34
2.4.1 Reativação de Virulência	40
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 GERAL	41
3.2 ESPECÍFICOS	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 AMOSTRAS	42
4.1.1 Amostras de <i>Acanthamoeba</i>	42
4.1.2 Amostras de Linhagens de Cultivo Celular	43
4.2 AXENIZAÇÃO DOS ISOLADOS	43
4.2.1 Meio de Cultura para <i>Acanthamoeba</i>	43
4.2.2 Axenização.....	43
4.3 CULTIVO DAS LINHAGENS DE CÉLULAS EPITELIAIS DE MAMÍFEROS.....	44
4.3.1 Manutenção das Linhagens Celulares	44
4.4 EFEITO CITOTÓXICO	45

4.4.1 Produção de Meio Condicionado.....	45
4.4.1.1 Produção de meio condicionado sem passagem prévia de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> à cultura celular de mamífero	45
4.4.1.2 Produção de meio condicionado com passagem prévia de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> à cultura celular de mamífero	46
4.4.2 Distribuição das amostras na placa	47
4.4.3 Leitura da placa do ensaio de efeito citotóxico	47
4.5 EFEITO CITOPÁTICO.....	48
4.6 ESTATÍSTICA	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 EFEITO CITOTÓXICO	50
5.2 EFEITO CITOPÁTICO.....	56
5.2.1 Virulência entre os isolados	61
5.2.2 Virulência entre genótipos diferentes	62
5.2.3 Virulência entre amostras de diferentes origens.....	63
5.2.4 Susceptibilidade da linhagem celular.....	63
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO	77
8 REFERÊNCIAS.....	78
ANEXOS	88

1 INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) são amplamente distribuídas em todos os continentes e podem ser encontradas em uma infinidade de ambientes, como solo, poeira, ar, água potável, piscinas, esgoto, água do mar, rios, lagos, água de torneira, soluções de lavagem ocular, lentes de contato, unidades de diálise, unidades de tratamento, bem como fluidos ou tecidos de orofaringe de indivíduo saudável (REZAEIAN et al., 2008; KHAN, 2006; TEIXEIRA et al., 2009; TRABELSI et al., 2012). Pela capacidade de existirem como organismos vivos livres na natureza e apenas ocasionalmente invadirem um hospedeiro e viverem como parasitos dentro do tecido do hospedeiro, as amebas de vida livre são chamadas de anfizóicas (PAGE, 1988).

O gênero *Acanthamoeba* está associado a doenças em humanos como a encefalite granulomatosa amebiana (EGA), lesões cutâneas, infecções da nasofaringe, pulmões e rins, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Também podem causar ceratite amebiana (CA) em indivíduos imunocompetentes (TRABELSI et al., 2012).

Existem dois tipos de classificação de *Acanthamoeba*: uma, baseada em sua morfologia e tamanho dos cistos, que divide o gênero em três grupos (I, II e III) e outra genotípica, que se baseia na identificação da variação da sequência do gene 18S rRNA, dividindo em genótipos que vão de T1 a T20 (TRABELSI et al., 2012).

Embora as manifestações clínicas das infecções por *Acanthamoeba* estejam bem descritas, os mecanismos precisos associados à patogênese desse protozoário ainda estão incompletamente compreendidos. Entretanto, sabe-se que a patogenicidade é um processo complexo, em que envolve múltiplos fatores, tanto referente ao parasito quanto ao hospedeiro, sendo que não há um fator único determinante que cause ou que permita que esses parasitos produzam doenças em humanos (KHAN, 2002). Uma das formas de analisar o potencial patogênico da *Acanthamoeba* é por meio da utilização de testes que identificam marcadores de virulência como, por exemplo, a sua capacidade de produzir efeitos citopático e citotóxico *in vitro*, com a utilização de linhagens celulares de mamíferos, destruindo essas células. Também podem ser utilizados parâmetros *in vivo*, verificando a

capacidade de infecção em animais de experimentação (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004). Outros testes de ensaios de tolerância a temperaturas próximas à do corpo humano e de sobrevivência a alta osmolaridade também são utilizados para identificar o potencial patogênico da *Acanthamoeba* (WALOCHNIK et al., 2000; KHAN et al., 2001).

Entretanto, os testes com marcadores de virulência podem ter seu resultado alterado devido às variações da virulência da ameba. É devidamente estabelecido que o processo de subcultivos prolongados e sucessivos de isolados de *Acanthamoeba* pode fazer com que ocorra uma diminuição da virulência desse protozoário, que pode ser restaurada pela passagem da ameba em cultura de linhagem celular ou por meio da passagem *in vivo* em animais de experimentação (STEVENS & O'DELL, 1974; MAZUR & HADAS, 1994; SCHUSTER, 2002).

São importantes estudos para verificar se a virulência da *Acanthamoeba* pode estar realmente relacionada ao genótipo da ameba, ou, por exemplo, a procedência do isolado (amostra clínica – raspado de córnea, ou amostra ambiental). Outro ponto que merece estudos é sobre a padronização de técnicas. As publicações na área não possuem um protocolo padrão em relação a vários aspectos importantes num ensaio, como por exemplo, o número de trofozoítos de ameba utilizado, a temperatura de cultivo da ameba, o tipo de célula de mamífero, o tempo do procedimento. Considerando a necessidade de estudos em relação à virulência e a falta de padronização das técnicas, avaliamos dois parâmetros que poderiam interferir na virulência de isolados: genótipos e a procedência das amostras de *Acanthamoeba*. Também analisamos os resultados da virulência utilizando três diferentes células de mamíferos – MDCK, VERO e CHO - e ainda utilizamos a linhagem MDCK para tentar restaurar a virulência das culturas mantidas em cultivo prolongado no laboratório.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *Acanthamoeba*

Acanthamoeba é a ameba de vida livre mais comumente encontrada. Por sua baixa exigência nutricional e pela sua capacidade de encistamento é amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada no solo (variando de regiões tropicais a árticas), areias de praia, água de lagoa, lagos de águas doce e salgada, água mineral engarrafada, garrafas de água destilada, partes de plantas, dutos de ventilação, unidades de ar-condicionado, umidificadores, poeira, lentes de contato, piscinas, esgoto, equipamentos hospitalares, unidades de diálise, grande variedade de organismos, como répteis, pássaros, peixes, mamíferos e seres humanos (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; KHAN, 2006; VISVESVARA et al., 2007; SIDDIQUI & KHAN, 2012). Já foi isolada em vegetais, animais como peixes, répteis, cães, macacos e pássaros, de secreções pulmonares, amostras de seios maxilares e fezes, cavidades nasais, garganta, esfregaços faríngeos, lesões cutâneas, urina de pacientes criticamente doentes, biópsias de córnea, líquido cefalorraquidiano e necrópsias cerebrais (VISVESVARA & SCHUSTER, 2007; TRABELSI et al., 2012; SIDDIQUI & KHAN, 2012).

Esse protozoário caracteriza-se por tolerar condições variáveis de osmolaridade, temperatura corporal humana a 37°C ou maiores temperaturas, salinidade e pH, sobrevivendo em água destilada, cultura de tecidos e fluído corporal de mamífero (TRABELSI et al., 2012).

O ciclo de vida da *Acanthamoeba* tem dois estágios: o trofozoíto, fase locomotiva ou proliferativa, e o cisto, fase dormente e de resistência (VISVESVARA et al., 1990) (**Figura 2**).

Os trofozoítos possuem tamanho correspondente a 12–35 µm de diâmetro, podendo variar consideravelmente entre diferentes espécies e caracterizam-se pela presença de um ou mais vacúolos contráteis, responsáveis pela regulação osmótica (BOWERS & KORN, 1973) (**Figura 1**). Além disso, existem outros vacúolos

citoplasmáticos como os lisossomos, vacúolos de glicogênio e vacúolos digestivos (SIDDIQUI & KHAN, 2012) (**Figura 1**). Na superfície do trofozoíto existe uma estrutura denominada acantapódio, que é importante na adesão em superfícies biológicas ou inertes, movimentos celulares e captura de presas. Os trofozoítos se alimentam de algas, fungos, bactérias e partículas orgânicas pequenas, enquanto que sua replicação ocorre por fissão binária.

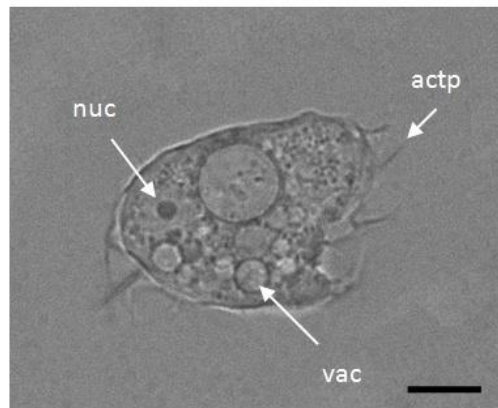


Figura 1: Trofozoíto de *Acanthamoeba*. Evidências de: nuc, núcleo; vac, vacúolos e actp, acantapódios. Escala da barra: 8 μ m. Fonte: arquivo fotográfico da Coleção de *Acanthamoeba* do Laboratório de Protozoologia da UFES.

Em condições ambientais desfavoráveis, como diminuição de alimento, alta ou baixa osmolaridade e extremas temperaturas e pH, os trofozoítos diferenciam-se em cistos, apresentando mínima atividade metabólica (KHAN, 2006) (**Figura 2**).

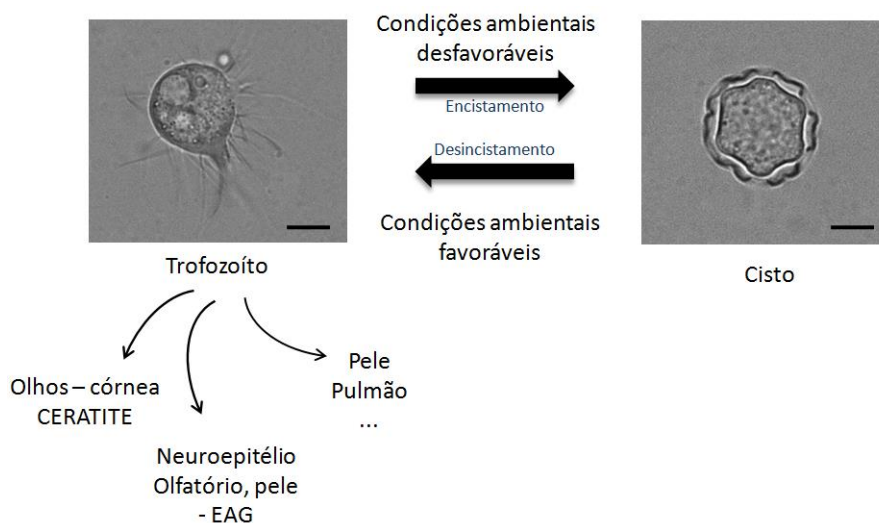


Figura 2: Ciclo de vida da *Acanthamoeba* e principais vias de infecções. Escala da barra: 8 μ m. Fonte: autora.

Nos cistos, a parede externa, denominada ectocisto, é composta por proteínas e polissacarídeos, e a parede interna, endocisto, é constituída de celulose. As paredes são separadas por um espaço, e em determinados pontos existem opérculos no centro de ostíolos, que são pontos onde o trofozoíto sai do cisto no processo desincistamento (SIDDIQUI e KHAN, 2012).

As AVLs *Acanthamoeba* e *Balamuthia* pertencem ao “Super Grupo” Amoebozoa, subdivisão Acanthamoebidae, *Naegleria fowleri* no “Super Grupo” Excavata, Heterolobosia: *Vahlkampfiidae* e *Sappinea* no “Super Grupo” Amoebozoa, subdivisão Thecamoebidae: Flabellinea, sendo esse esquema proposto para servir de base para revisões futuras (ADL et al., 2005).

2.1.1 Classificação Morfológica

Inicialmente, aos isolados de *Acanthamoeba* foram nomeados com base no nome do isolador, da fonte ou outros critérios. Em 1977, com o número crescente de isolados desse gênero, Pussard & Pons baseando-se em duas características morfológicas dos cistos, sendo elas o tamanho e a forma, adequaram a classificação do gênero *Acanthamoeba* em três grupos (KHAN, 2006). Mais de 24 espécies do gênero *Acanthamoeba* estão organizadas baseadas nesse critério morfológico (BOOTON et al., 2005; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008).

No **Grupo I** encontram-se as espécies que apresentam cistos com maiores dimensões em comparação aos grupos II e III (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003), com diâmetros variando entre 16 a 30 μm (KHAN, 2006; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008) e com ectocisto e endocisto amplamente separados, sendo o ectocisto em forma mais ou menos esférica e o endocisto em forma estrelada (PUSSARD & PONS, 1977; KHAN, 2006) (**Figura 3a**). As espécies *Acanthamoeba astronyxis*, *Acanthamoeba comandoni*, *Acanthamoeba echinulata* e *Acanthamoeba tubiashi* pertencem a esse grupo (KHAN, 2006).

No **Grupo II** estão as amebas do gênero *Acanthamoeba* mais comumente isoladas, cujos ectocistos e endocistos dos cistos podem estar próximos ou amplamente

separados (KHAN, 2006) (**Figura 3b**). Os ectocistos caracterizam-se por serem enrugados, podendo ser finos, espessos, redondos, ovais, triangulares ou poligonais, com um diâmetro médio de cerca de 18 μm ou menos (KHAN, 2006; MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008). Exemplos desse grupo são *Acanthamoeba mauritaniensis*, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba quina*, *Acanthamoeba divionensis*, *Acanthamoeba triangularis*, *Acanthamoeba lugdunensi*, *Acanthamoeba griffini*, *Acanthamoeba rhyodes*, *Acanthamoeba paradivionensis* e *Acanthamoeba hatchetti* (KHAN, 2006).

No **Grupo III**, os cistos medem um diâmetro de aproximadamente de 18 μm ou menos e são caracterizados por possuírem um fino e suave ectocisto, com difícil visualização, e um endocisto arredondado ou levemente angular (**Figura 3c**). Neste grupo se encontram as espécies *Acanthamoeba palestinensis*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba royreba*, *Acanthamoeba lenticulata* e *Acanthamoeba pustulosa*, por exemplo (KHAN, 2006; MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008).

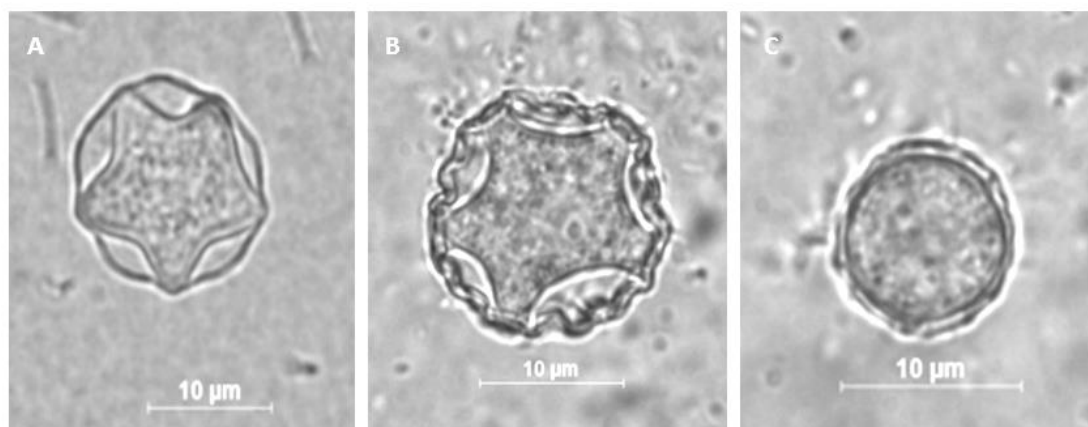


Figura 3: Cistos de *Acanthamoeba* com características típicas dos grupos morfológicos. A) Cisto de grupo morfológico I; B) Cisto de grupo morfológico II; C) Cisto de grupo morfológico III. Fonte: arquivo fotográfico da Coleção de *Acanthamoeba* do Laboratório de Protozoologia da UFES.

A identificação de espécies baseadas nos aspectos morfológicos não é considerada confiável, uma vez que as características morfológicas dos cistos sofrem influência das condições ambientais (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; KHAN, 2006), como demonstrado em 1978 por Stratford e Griffiths, num estudo sobre as variações nas

propriedades morfológicas de cistos de *A. castellanii*, tendo como resultado a observação de variações na morfologia dos cistos de acordo com as condições de cultivo.

2.1.2 Classificação Genotípica

No final da década de 1970, novos aspectos taxonômicos para o gênero *Acanthamoeba* foram surgindo a partir da necessidade de uma nova categorização diferente de critérios morfológicos, uma vez que critérios bioquímicos e moleculares indicaram inconsistências nesses antigos padrões de classificação (FUERST et al., 2015).

Atualmente, com o intuito de diferenciar isolados e compreender melhor a filogenia da *Acanthamoeba*, o sequenciamento do gene que codifica a subunidade pequena (SSU) do RNA ribossomal (rRNA ou 18S rDNA) vem sendo a metodologia mais utilizada (GAST et al., 1996; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008; FUERST et al., 2015). Inicialmente proposta por Gast e colaboradores (1996), a técnica foi utilizada num estudo mais abrangente realizado por Stothard e colaboradores (1998). Nesse estudo, foram classificados 53 isolados de *Acanthamoeba* oriundos de amostras de água, solo e poeira e de amostras clínicas em 12 tipos de genótipos (T1 a T12), sendo que os genótipos foram separados a partir da detecção de uma diferença maior do que 5% (> 2000 pb) entre as sequências do gene SSU do rRNA. Com isso, posteriormente este valor de 5% foi amplamente aplicado por vários outros autores no intuito de delimitar genótipos (CORSARO et al., 2015). No ano de 2005, Maghsoud e colaboradores propuseram a divisão do genótipo T2 em dois outros grupos, T2a e T2b, pela observação da existência de uma dissimilaridade de 4,9% entre eles, ou seja, muito próximo do ponto de corte de 5% padronizado para distinguir diferentes genótipos.

Com base nesse sequenciamento, até o momento a taxonomia molecular descreve 20 genótipos diferentes (T1 a T20) dentro do gênero *Acanthamoeba*. Após os estudos de Stothard e colaboradores (1998), Horn e colaboradores (1999) propuseram mais dois genótipos, T13 e 14, que posteriormente entendeu-se

pertencerem a um único genótipo T13 (HEWETT et al., 2003). Em 2003, Hewett e colaboradores reconheceram o genótipo T14, proposto por Gast (2001), e isolaram o genótipo T15. O genótipo T16 foi estabelecido por Corsaro & Venditii (2010). Ainda em 2010, o genótipo T17 foi identificado por Nuprasert e colaboradores a partir de uma amostra ambiental. Qvarnstrom e colaboradores em 2013 identificaram o genótipo T18 patogênico, classificando-o no Grupo I, obtido a partir de um isolado de pele e tecido cerebral de um paciente imunossuprimido com EGA, sendo considerado o primeiro representante patogênico do Grupo I (CORSARO et al., 2015). Mais recentemente, foram identificados os genótipos T19 e T20, sendo que o genótipo T19 foi isolado de uma amostra ambiental (MAGNET et al., 2014) e o genótipo T20, patogênico, foi recuperado por Fuerst e colaboradores (2015) de uma amostra isolada a partir de tecido hepático de um tucano, num caso de infecção letal por *Acanthamoeba* que inicialmente fora identificada como T4 por Visvesvara e colaboradores (2007) (CORSARO et al., 2015).

Com a classificação genotípica é possível analisar a diversidade do gênero *Acanthamoeba*, observando a sua epidemiologia e distribuição mundial, além de explicar a capacidade dessas amebas em colonizar diferentes tipos de ambientes (MAGNET et al., 2014).

2.2 IMPORTÂNCIA MÉDICA

A habilidade da *Acanthamoeba* em produzir doenças em humanos é um processo multifatorial, dependente tanto do parasito quanto do hospedeiro, estando ligado à capacidade da sobrevivência desse protozoário fora do meio interno do mamífero, estando em contato com diversas condições ambientais (KHAN, 2006).

Se uma ameba é isolada de uma infecção no homem, por exemplo, a partir de tecido cerebral ou de córnea, ela é patogênica, pois foi capaz de infectar e causar danos ao hospedeiro, entretanto, amostras ambientais podem ser patogênicas ou não patogênicas (SCHUSTER, 2002).

Antigamente, estudos que tentavam relacionar a patogenicidade de *Acanthamoeba* com as espécies utilizando a classificação morfológica encontraram inconsistências. A classificação da *Acanthamoeba* baseada em suas características morfológicas ainda está em uso, embora não tenha muita importância científica. Assim, tem-se tentado desenvolver ensaios que sejam capazes de auxiliar na diferenciação entre isolados patogênicos e não patogênicos de *Acanthamoeba* (VISVESVARA, 1991; KHAN et al., 2000). Dessa forma, parâmetros morfológicos e fisiológicos, além de vários modelos experimentais, têm sido propostos e investigados no decorrer dos anos (GRIFFIN, 1972; DE JONCKHEERE, 1980; DA ROCHA-AZEVEDO e COSTA e SILVA-FILHO, 2007).

O potencial patogênico de isolados de *Acanthamoeba* pode ser diretamente avaliado por meio de modelos *in vivo* (MARTÍNEZ, 1985; HE et al., 1990), mediante inoculação em ratos, usualmente por via intranasal, de suspensões de amebas (SCHUSTER, 2002). Como esse procedimento é mais lento e depende da utilização de animais, estudos *in vitro* têm sido utilizados para analisar marcadores indiretos de virulência.

Alguns parâmetros *in vitro* associados à patogenicidade e utilizados como marcadores de virulência são: tolerância a temperaturas acima de 37° C e a alta osmolaridade, sendo estes fatores utilizados amplamente na literatura em testes para identificação de isolados patogênicos; taxa de crescimento; citotoxicidade; produção de proteases e a capacidade de produzir efeito citopático, a citopatogenicidade, quando incubados previamente com linhagens celulares, que são populações de células específicas originadas pelo subcultivo sequencial de uma população celular primária (DE JONCKHEERE, 1991; WALOCHNICK et al., 2000; KHAN et al., 2001; KHAN, 2006).

2.2.1 Infecções Causadas por *Acanthamoeba*

2.2.1.1 Ceratite Amebiana

Uma das doenças em humanos provocadas por *Acanthamoeba* é a chamada ceratite amebiana (CA), sendo os primeiros casos descritos em 1973, caracterizando-se por ser uma grave infecção da córnea (NAGINGTON et al., 1974; VIVESVARA & STEHR-GREEN, 1990). Ocorre principalmente em usuários de lente de contato, sendo que um dos principais fatores de risco para a CA é o uso contínuo de lentes de contato. Entretanto, a *Acanthamoeba* pode causar infecção em não usuários dessas lentes (LORENZO-MORALES et al., 2015).

Segundo Stopak e colaboradores (1991) para a *Acanthamoeba* causar ceratite não seria necessário um trauma antecedente da córnea, uma vez que esse protozoário pode consumir células epiteliais intactas e sobreviver. Esse consumo leva a ruptura da camada epitelial, afirmando, também, que a virulência relaciona-se a uma tensão individual do protozoário e com o tamanho do inóculo desse microrganismo, fatores estes que podem ser responsáveis por variações na taxa de progressão e no grau de destruição da doença.

Tanto o diagnóstico quanto o tratamento da CA são complicados. Os medicamentos utilizados na terapia não são totalmente eficazes, além de ser necessário um tempo longo de uso e dos cistos serem resistentes. (LORENZO-MORALES et al., 2015).

2.2.1.2 Encefalite Granulomatosa Amebiana

A Encefalite Granulomatosa Amebiana (EGA) ocorre em indivíduos imunocomprometidos ou em pacientes debilitados levando, quase sempre, a morte. Os fatores predisponentes são a infecção por HIV, diabetes, terapia imunossupressora, câncer, alcoolismo ou má nutrição. Os fatores de risco para esses pacientes incluem a exposição em água contaminada de piscinas, praias,

trabalho de jardinagem, em que há exposição ao solo (KRÓL-TURMINSKA & OLENDER, 2017).

No início da EGA ocorrem manifestações neurológicas e alterações comportamentais. Outros sintomas da doença são quadros de convulsões, dor de cabeça, distúrbios visuais, rigidez de pescoço, estado mental anormal, náuseas, vômitos, febre baixa, letargia, ataxia cerebelar, hemiparesia e coma (BLOCH & SCHUSTER, 2005).

As portas de entrada para *Acanthamoeba* ao Sistema Nervoso Central (SNC) são as vias olfatórias, pelo neuroepitélio olfativo, ou capilares cerebrais por meio da corrente sanguínea. Uma outra via seria pelo trato respiratório, quando então as amebas atingem os vasos sanguíneos alveolares, seguida de distribuição hematogênica. Lesões cutâneas também podem favorecer entrada na corrente sanguínea, contornando o trato respiratório inferior. Pelo revestimento endotelial dos capilares cerebrais é que, provavelmente, ocorre a entrada da *Acanthamoeba* no SNC (MARTINEZ, A. J, 1985; MARTINEZ, A. J., 1991; VISVESVARA et al, 2007) **(Figura 2)**.

Acanthamoeba pode causar lesões na pele, no fígado, nos pulmões e nos rins, fato que acaba por sugerir que pode ocorrer uma disseminação hematogênica. No entanto, o que confere a atração da ameba pelo SNC ou outras partes do corpo, ainda permanece desconhecido (KRÓL-TURMINSKA & OLENDER, 2017; ONG et al., 2017).

2.2.2 Os diferentes genótipos de *Acanthamoeba* e sua associação com grupos morfológicos e doenças

O genótipo de maior prevalência tanto em amostras clínicas quanto em ambientais é o genótipo T4 (LEDEE et al., 2009). A maioria das infecções humanas por *Acanthamoeba* está associada ao genótipo T4. Esse genótipo é o responsável por cerca de 90% dos casos de ceratite. Essa associação do genótipo T4 com os casos de ceratite ainda precisa ser bem elucidada, por não se saber se é devido a alta

prevalência de T4 no ambiente ou se o mesmo apresenta uma maior virulência (STOTHARD et al., 1998; WALOCHNIK et al., 2000; MAGHSOOD et al., 2005; LEDEE et al., 2009). O **Quadro 1** relaciona os grupos morfológicos com a classificação genotípica, bem como as respectivas doenças relacionadas.

Outras infecções causadas por *Acanthamoeba*, como, por exemplo, infecções do pulmão, pele e cérebro, foram relacionadas por uma variação maior de genótipos, como o T1, T4, T10 e T12 (STOTHARD et al., 1998). Dessa forma, o genótipo vem sendo utilizado como marcador de potencial patogênico de *Acanthamoeba* (BOOTON et al., 2004). A genotipagem de *Acanthamoeba* é útil nos estudos taxonômicos e de relações epidemiológicas, permitindo, assim, que as associações entre os isolados infecciosos e os fenótipos da doença, como fatores de virulência, susceptibilidade a drogas, possam ser exploradas (LEDEE et al., 2009).

Quadro 1: Relação dos genótipos e grupos morfológicos de *Acanthamoeba* e suas associações com doenças humanas

Genótipo	Grupo Morfológico	Doença Associada
T1	II	Encefalite
T2a	II	NA ^b
T2b	II	Ceratite
T3	II	Ceratite
T4	II	Ceratite, encefalite
T5	III	Ceratite, encefalite
T6	III	Ceratite
T7	I	NA ^b
T8	I	NA ^b
T9	I	NA ^b
T10	III	Encefalite
T11	II	Ceratite
T12	II	Encefalite
T13	ND ^a	Ceratite
T14	II	Ceratite
T15	III	Ceratite
T16	III	Ceratite
T17	I	NA ^b
T18	I	Encefalite
T19	ND ^a	NA ^b
T20	ND ^a	NA ^b

^aND: grupo morfológico não definido. ^bNA: ainda não associado com qualquer doença. Fonte: adaptado de Khan (2006)

2.3 PATOGÊNESE de *Acanthamoeba*

A patogenicidade tem caráter multifatorial e complexo, dependente tanto de fatores do microrganismo quanto do hospedeiro. Ainda, esses mecanismos patogênicos de *Acanthamoeba* ainda não estão totalmente elucidados ou compreendidos.

Didaticamente, dividem-se os mecanismos patogênicos da *Acanthamoeba* em fatores diretos e indiretos de virulência. Os fatores diretos de virulência podem ser dependentes de contato e independentes de contato. Os mecanismos dependentes de contato envolvem a adesão, a fagocitose e a apoptose. Os mecanismos independentes de contatos estão relacionados à produção de proteases. Os fatores indiretos de virulência relacionam-se a fatores do hospedeiro e a fatores inerentes à ameba como a sua morfologia, a sua tolerância fisiológica, a sua mudança fenotípica, a capacidade de resistência a drogas, a ubiquidade e a produção de biofilmes (KHAN, 2006).

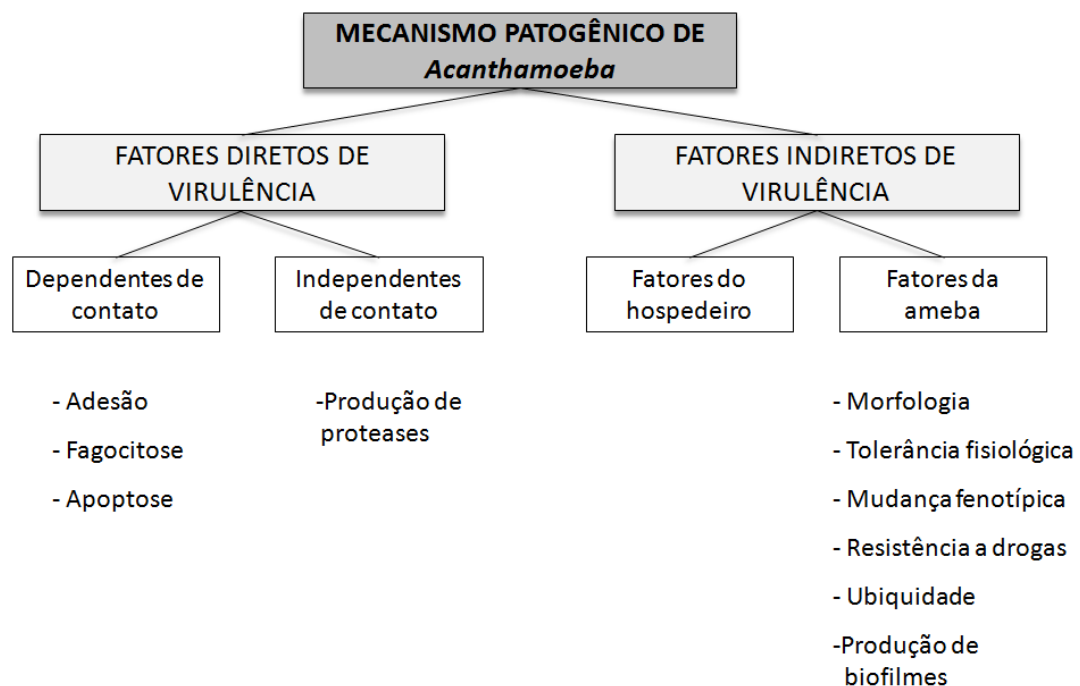


Figura 4: Mecanismo de patogenicidade de *Acanthamoeba*. Adaptado de: Khan, 2000, 2006.

A patogênese da infecção por *Acanthamoeba* envolve adesão nas células do hospedeiro, degradação e invasão de tecidos, tanto nos casos de ceratite amebiana, quanto nos casos de encefalite granulomatosa amebiana (HONG et al., 2000; GARATE et al., 2004; HONG et al., 2004), principalmente pela ação das proteases, que promovem a separação celular. A fagocitose das células que foram separadas ou daquelas ligadas ao epitélio da córnea modifica a arquitetura celular, facilitando o acesso da ameba às camadas mais profundas da córnea, o que sugere que a atividade dependente do contato é um importante mecanismo patogênico de *Acanthamoeba* (OMANÑA-MOLINA et al., 2013).

Sabe-se que para promover a lesão é necessário que exista, primeiramente, um contato direto, físico, da ameba com o hospedeiro. O processo de adesão é mediado por moléculas de adesina, que são, então, fundamentais na patogênese desse protozoário. *Acanthamoeba* usa o processo de adesão em células hospedeiras como passo inicial antes de prosseguir para atingir tecidos mais profundos e produzir ceratite, bem como para evitar ser lavada dos olhos no início da doença (KHAN, 2003). Com o processo de adesão, ocorrem outros mecanismos de patogenicidade, como a ativação da produção de enzimas proteolíticas (CAO et al., 1998) e a fagocitose (KHAN, 2001), levando a danos teciduais característicos ou morte celular, apoptose (ALIZADEH et al., 1994).

Uma das principais adesinas é a proteína ligadora de manose (MBP – *Mannose Binding Protein*), expressa na superfície da ameba, com peso molecular de 400 kDa e constituída por múltiplas subunidades de 130 kDa (GARATE et al., 2004; SIDDIQUI & KHAN, 2012) que se liga a glicoproteínas contendo manose na superfície da célula hospedeira (KHAN, 2006). Essa ligação pode ser inibida pela presença de α -manose exógena (MORTON et al., 1991; YANG et al., 1997; KHAN, 2003). A expressão de MBP ocorre somente na fase trofozoítica, sendo que os cistos não possuem MBP, não podendo, portanto, estes se ligarem às células hospedeiras (GARATE et al., 2006; KHAN, 2006).

A ligação da *Acanthamoeba* na superfície celular do hospedeiro interfere nas vias de sinalização intracelular do mesmo, ocorrendo indução de apoptose nas células hospedeiras. A apoptose, ou morte celular programada, é dependente da própria

sinalização da célula hospedeira, envolvendo respostas aos níveis de Ca^{2+} (TAYLOR et al., 1995; KHAN, 2006). A ligação da *Acanthamoeba* promove o aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular na célula alvo, exercendo efeitos no citoesqueleto, indução de alterações morfológicas, alterações da permeabilidade da membrana plasmática, levando a morte celular em poucos minutos (MATTANA et al., 1997; KHAN, 2006).

Vários estudos têm demonstrado que trofozoítos de *Acanthamoeba* são capazes de promover a indução de apoptose em células normais ou tumorais de mamíferos em testes *in vitro*, com a visualização de DNA fragmentado, condensação de cromatina, flacidez celular, desorganização da membrana, formação de corpos apoptóticos, que são marcadores de apoptose (ALIZADEH et al., 1994; KHAN, 2003).

Desta forma, a capacidade da ameba de aderir ao epitélio celular é um mecanismo fundamental para o estabelecimento da doença, sendo um importante fator de virulência e característico na determinação da patogenicidade de isolados (VAN KLINK et al., 1992; KHAN, 2001; ALSAM et al., 2003).

Um dos processos secundários à adesão é a fagocitose, e é por ela que a *Acanthamoeba* internaliza células epiteliais do hospedeiro, bem como partículas de alimentos, como bactérias e leveduras, incluindo formas circulares de látex (DEARBORN & KORN, 1974; PRESTON & KING, 1984; BOWERS & OLSZEWSKI, 1983; ALLEN & DAWIDOWICZ, 1990; AVERY et al., 1995; KHAN, 2003). Estudos de Khan e colaboradores (2001) demonstraram que a *Acanthamoeba* é capaz de realizar fagocitose em células epiteliais de córnea de coelho, que são fisiologicamente semelhantes a células corneais de olho humanos, sugerindo, então, que a fagocitose ocorre, também, na ceratite amebiana.

Entretanto, ainda permanece indeterminado se a fagocitose e a apoptose são processos independentes na patogênese das infecções por *Acanthamoeba*, ou se a apoptose acontece primariamente, sendo estimulada pela ligação da ameba à célula hospedeira (KHAN, 2003).

O processo de adesão também ativa a produção de enzimas pelas amebas (CAO et al., 1998). As enzimas ou proteases proteolíticas são um grupo de enzimas que tem por função catalisar a degradação das ligações peptídicas. Em protozoários parasitos, as proteases são os principais determinantes de patogenicidade, estando diretamente envolvidas na invasão e destruição de tecidos (MCKERROW et al., 1993; KHAN, 2003). Khan e colaboradores (2000) demonstraram que *Acanthamoeba* patogênicas exibiram um aumento das atividades de proteases extracelulares. Produtos excretores e de secreção de um isolado de *A. polyphaga* (proveniente de ceratite amebiana), o chamado meio condicionado, foram avaliados em relação à atividade da protease. A caracterização parcial dos produtos demonstrou que trofozoítos de *A. polyphaga* secretam várias proteases (serinoproteases, cisteinoproteases e metaloproteases) que são capazes de degradar o colágeno tipo I, principal componente da matriz estromal da córnea (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003).

Por outro lado, a capacidade da *Acanthamoeba* em produzir doenças em humanos é dependente de sua habilidade de sobreviver fora do hospedeiro por tempo indeterminado e em condições ambientais diversas, como em temperaturas variadas e alta osmolaridade na superfície da córnea. Portanto, fatores do hospedeiro e do meio ambiente apresentam papéis fundamentais na determinação da transmissão bem-sucedida desse patógeno (KHAN, 2003).

Ao entrar em contato com os olhos, a *Acanthamoeba* é exposta ao filme lacrimal e às células epiteliais da córnea, em que há a presença de alta osmolaridade da lágrima e também altas temperaturas. Para que a infecção seja bem-sucedida, a ameba deve ser resistente, sobreviver a essa exposição adversa, bem como demonstrar crescimento. Esse crescimento em temperatura e osmolaridade elevadas é uma característica da *Acanthamoeba* que se relaciona com a sua patogenicidade, sendo os mecanismos de adaptação a esses ambientes com manutenção de suas atividades metabólicas ainda desconhecidos (DE JONCKHEERE, 1983; WALOCHNIK et al., 2000; KHAN et al., 2001, 2002, 2006). Esses ensaios têm sido utilizados como forma de identificar e diferenciar isolados patogênicos e não patogênicos (KHAN, 2003).

A mudança fenotípica diz respeito à habilidade da *Acanthamoeba* de se diferenciar em uma forma dormente, o cisto, ou em uma forma vegetativa, o trofozoíto, sendo essa reversão dependente de fatores ambientais. Os cistos são resistentes a agentes antimicrobianos, o que gera um problema em quimioterapia, pois pode levar a uma recorrência da doença. Podem, também, sobreviver em condições de um ambiente agressivo, como a altas temperaturas e à dessecação e, ainda, serem transportados pelo vento (WEISMAN, 1976; BYERS, 1979; CORDINGLEY et al., 1996; TURNER et al., 2000; KHAN, 2003, 2006). Cistos de *Acanthamoeba* podem sobreviver durante anos sem perder a suas características patogênicas (MAZUR et al., 1995). A mudança fenotípica pode, então, explicar a disseminação da *Acanthamoeba* em todo o meio ambiente, sendo um importante fator de transmissão da doença. Entretanto, os mecanismos moleculares desse processo ainda não são bem elucidados (KHAN, 2003).

2.4 TESTES COM MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE *Acanthamoeba*

Devido à gravidade das doenças provocadas por *Acanthamoeba* existe uma necessidade de se obter uma ferramenta rápida e precisa de distinguir isolados que são patogênicos dos não patogênicos (CURSON & BROWN, 1978).

O crescimento em altas temperaturas, ou em alta osmolaridade e o crescimento em meio axênico (cultivo livre de qualquer outro microrganismo que não a ameba) são utilizados como indicadores de potencial patogênico dos isolados. No entanto, é necessário que esses isolados sejam testados em cultura celular (teste *in vitro*) ou em modelo animal (teste *in vivo*), de forma a determinar as suas virulências (DE JONCKHEERE, 1980; REN & WU, 2010). Isso se deve ao fato de que alguns isolados mostraram uma diminuição na termotolerância após serem mantidos em cultura axênica de longo prazo (PUMIDONMING et al., 2010).

Desde o final da década de 1950 estudos têm sido realizados para determinar a capacidade de isolados patogênicos de *Acanthamoeba* de causar infecções em cobaias, sobretudo das amostras clínicas, definindo um modelo de análise de patogenicidade (CULBERTSON et al., 1959; VISVESVARA & BALAMUTH, 1975).

Dentre os animais que são utilizados para tal fim, estão os camundongos, coelhos, macacos, ratos, entre outros (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003). No entanto, os modelos em animais mostram diferenças importantes quanto à susceptibilidade ao hospedeiro (DE JONCKHEERE, 1980). Além disso, existem complicações quanto das variações nas técnicas de inoculação empregadas (CURSONS & BROWN, 1978).

Em 1980, De Jonckheere analisou o efeito citopático em cultura celular e a virulência *in vivo* de diferentes isolados de *Acanthamoeba* e chegou à conclusão de que a virulência de *Acanthamoeba* poderia ser medida em cultura de células ou em animais de laboratório. Demonstrou-se que existe uma associação entre a citopatogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* para culturas celulares e a patogenicidade em animais, como descrito por Badenoch e colaboradores (1995), em que encontraram uma associação de 86% entre a virulência de *Acanthamoeba in vivo* e *in vitro*. Dessa forma, modelos com cultura de células de mamíferos são adotadas como indicadores de patogenicidade em *Acanthamoeba* (CURSONS & BROWN, 1978). Assim, culturas de células de mamíferos devem ser ferramentas úteis para examinar as bases moleculares para células alvo, podendo fornecer dados em testes de efeito citopático que distinguem entre a virulência da ameba e os fatores do hospedeiro (MARCIANO-CABRAL et al., 1982).

O efeito citopático (EC) é o efeito produzido pelos trofozoítos de *Acanthamoeba* sobre uma monocamada de cultura celular. Ao incubar as amebas com as células, em algumas horas é possível visualizar áreas em que não existe mais a monocamada celular. Com o prolongamento do tempo de incubação, o tamanho dessas áreas sem células aumenta e, eventualmente, pode resultar numa perda quase completa da camada celular (PANJWANI, 2010). Esse efeito citopático é resultado da morte de células hospedeiras e da destruição da matriz extracelular por proteases secretadas pelas amebas. Existe uma associação entre a virulência e o nível de expressão de proteases em amebas patogênicas (SERRANO-LUNA et al., 2013). Testes realizados por Khan e colaboradores (2000) demonstraram que isolados patogênicos de *Acanthamoeba* apresentaram uma alta atividade de proteases extracelulares em comparação com espécies não patogênicas.

Amebas de vida livre patogênicas são conhecidamente capazes de provocar EC em células de mamíferos *in vitro* e *in vivo*. Trofozoítos de *Acanthamoeba* lisam células alvos neoplásicas e não neoplásicas, um EC mediado por citólise direta. De uma forma geral, essa citólise pode ocorrer por meio da interrupção da integridade da membrana celular por necrose por meio de moléculas líticas formadoras de poros ou por apoptose, ou, possivelmente, de forma aditiva, como descrito por Alizadeh e colaboradores (1994).

Trofozoítos patogênicos foram descritos por exibirem efeito citopático em uma variedade de células (TAYLOR et al., 1995) e com diversas metodologias (**Quadro 2**). Diversos tipos de células são utilizadas nos testes *in vitro*, como células epiteliais renais e de córnea (LARKIN et al., 1991; LEHER et al., 1998; KHAN, 2001; KIM et al., 2006), neuroblastoma, fibrosarcoma (LARKIN et al., 1991; PIDHERNEY et al., 1993) fibroblastos (TAKAOKA-SUGIHARA et al., 2012). Outros tipos de células comumente também utilizadas são a MDCK (*Madin Darby Canine Kidney Cell Line*, células renais de cão) (OMANÑA-MOLINA et al., 2013; GONZÁLES-ROBLES et al., 2013; GONZÁLES-ROBLES et al., 2014; CHÁVEZ-MUNGUÍA et al., 2016), VERO (célula de rim de macaco verde africano) (CURSONS & BROWN, 1978; DE JONCKHEERE, 1980; VISVESVARA & BALAMUTH, 1975) e CHO (*Chinese Hamster Corneal Epithelial Cells*, células do epitélio corneal de hamster chinês) (JEONG et al., 2005; YOO & JUNG, 2012).

Ao observar o **Quadro 2**, é possível observar a diversidade de linhagens celulares utilizadas, assim como o número de trofozoítos de ameba, o tempo de incubação e a técnica para análise do experimento.

Quadro 2: Tipos de metodologias empregadas nos testes de efeito citopático ou citotóxico de isolados de *Acanthamoeba*

Autor	Linhagem Celular	Material	Quantidade de ameba	Tempo de incubação	Análise
Visvesvara e Balamuth, 1975	VERO	Placa de Petri	25, 50, 10 ² , 10 ³ e 10 ⁴ / 0,5 mL de meio de cultura	1, 2 e 3 dias	Visual
Jonckheere, 1980	VERO	Garrafa de cultura de 75 cm ³	1,5 x 10 ⁵ trof. ^e	Diariamente por 3 semanas	Visual
Taylor et al., 1995	OCM1 ^a	Placa de 96 poços	2,5x10 ⁵ trof./poço	30 a 180min	Ensaio de espectrofotometria
Leher et al., 1997	CHEC	Placa de 96 poços	2,5x10 ⁵ trof./poço	48h	Densidade óptica, leitura em 590 nm
Alsam et al., 2003	HBMEC ^b	Placa de 24 poços	5 x 10 ⁵ trof./poço	24h	Coloração com hematoxilina e sobrenadante (LDH)
Jeong et al., 2005	CHO	Placa de 96 poços	6x10 ⁴ trof./poço	24h	Mensuração de LDH
Sissons et al., 2006	HBMEC ^c	Placa de 24 poços	5 x 10 ⁵ trof./poço	24h	Mensuração de LDH
González-Robles et al., 2006	MDCK	Garrafa de cultura	Proporção 1 cell:2 ameba e 1:1 (1-2h)	A cada hora por 6 horas, 12 e 24h	Resistência elétrica Transepitelial
Kim et al., 2006	HCE ^d	Placa de 96 poços	5 x 10 ⁵ trof./poço	24h	Visualmente por coloração com Giemsa e medição da densidade óptica de células solubilizadas
Alsam et al., 2007	HCE	Placa de 96 poços	5 x 10 ⁴ trof./poço	?	Mensuração de LDH
Yoo & Jung, 2012	CHO	Placa de 24 poços	5 x 10 ⁵ trof./poço	24h	Mensuração de LDH
Takaoka-Sugihara et al., 2012	Fibroblastos da córnea humana	Placa de 24 poços	1x10 ⁴ trof./poço	2 dias	MTT
Omona-Molina et al., 2012	MDCK	Placa de 24 poços	1:1	1, 2 e 3h	visual
González-Robles et al., 2014	MDCK	Placa de 24 poços	1:2	6, 12, 16 e 24h	visual

^aOCM1: *Human Uveal Melanome Cell line*

^bCHEC: *Chinese Hamster Corneal Epithelial Cells*

^cHBMEC: *Human Brain Microvascular endotelial cells*

^dHCE: *Human corneal epithelial cell culture*

^eTrof.: trofozoítos

Ao estudar a susceptibilidade *in vitro* de córneas de várias espécies de animais, Niederkorn e colaboradores (1992) observaram que trofozoítos de *A. castellanii* exibem especificidade rígida em relação ao hospedeiro para ligação à superfície epitelial da córnea. Lesões progressivas e associação íntima com as células alvo evidenciam-se, bem como numerosas áreas esfoliadas em tecidos de córnea humana, de hamster chinês e de córnea de porco, contrastando com o não evidente processo em tecidos de cão, cavalo, vaca, córnea de frango e de coelho. Esses dados indicariam uma hospedeiro-especificidade em nível celular, sugerindo a presença de reconhecimento do protozoário de moléculas de superfície específicas da espécie no epitélio da córnea.

Dessa forma, testes com efeito citopático são considerados meios confiáveis para determinar se uma linhagem é patogênica ou não patogênica (CURSONS & BROWN, 1978; DE JONCKHEERE, 1980), sendo associada à patogenicidade em animais apresentada por isolados clínicos de humanos e isolados ambientais (BADENOCH et al., 1995). O modelo de citopatogenicidade relaciona-se aos fatores diretos de virulência da ameba, com os mecanismos dependentes de contato, como a adesão, fagocitose e apoptose, por exemplo, uma vez que há contato entre o trofozoíto e a célula de mamífero em monocamada de cultura.

Considerando os fatores diretos de virulência da ameba, no início da patogênese da infecção, o epitélio corneal é afetado na ceratite por *Acanthamoeba*, com deslizamento epitelial e necrose evidentes, tanto em seres humanos, quanto em animais experimentais, fato este que sugere que a *Acanthamoeba* produz efeitos citopáticos diretos durante o início da infecção. Estudos *in vitro* mostraram que trofozoítos de *Acanthamoeba* produzem extenso EC sobre uma grande variedade de células tumorais (PIDHERNEY et al., 1993; ALIZADEH et al., 1994), bem como em células epiteliais da córnea (LARKIN et al., 1991; STOPAK et al., 1991; VAN KLINK et al., 1992; ALIZADEH et al., 1994).

Alguns estudos sobre a interação com outros protozoários mostraram que as monocamadas de células epiteliais de MDCK são modelos adequados para estudar a atividade citolítica *in vitro* entre as amebas, ou outros parasitos, e as células-alvo, considerando que essa monocamada consiste na formação de uma camada

contínua parecida a uma barreira epitelial (GONZÁLEZ-ROBLES et al., 2006). Cursons & Browns (1978) realizaram testes de efeito citopático em linhagens celulares e observaram que a linhagem celular VERO permite uma clara diferenciação entre espécies patogênicas e não patogênicas, uma vez que todos os isolados que apresentaram efeito citopático positivo provocaram a morte em ratos. Os que não apresentaram efeito citopático não provocaram a morte em ratos. Shin e colaboradores (1993) demonstraram que, utilizando células CHO como células alvo, isolados de *Acanthamoeba* altamente virulentos mostraram maior citotoxicidade do que amebas pouco virulentas.

O efeito citotóxico também é realizado em cultura de linhagem celular. Entretanto, tal efeito não tem sido observado mediante o inóculo de trofozoítos da ameba, mas sim pelo contato do meio de cultura que contém fatores líticos solúveis produzidos pela ameba, as proteases. Espécies patogênicas de *Acanthamoeba* produzem danos em célula hospedeira ou em tecidos por meio de sua capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, as proteases e fosfolipases (ALFIERI et al., 2000; CHO et al., 2000).

Estudos com meios condicionados de *Acanthamoeba*, que são meios onde se encontram as proteases, têm demonstrado que eles produzem efeito citotóxico em células epiteliais e em tecidos de córnea, sugerindo que as proteases secretadas estão envolvidas em desagregação de células epiteliais (KHAN et al., 2000; KHAN, 2003). Logo, o efeito citotóxico é resultado da produção de proteases e de outras enzimas produzidas pelas amebas.

Portanto, os marcadores de virulência da *Acanthamoeba* relacionam-se a sua capacidade de produzir proteases, efeito citopático e efeito citotóxico sobre células. Obviamente, esses três marcadores de virulência estão correlacionados nos eventos do mecanismo de patogenicidade da *Acanthamoeba*. Os efeitos citotóxico e citopático sobre as linhagens celulares podem ser pouco ou muito intensos, de acordo com a extensão da destruição da monocamada da cultura celular e a capacidade da ameba em produzir proteases (KHAN, 2006).

2.4.1 Reativação de Virulência

O processo de subcultivos sucessivos de um isolado pode fazer com que ocorra uma perda de virulência em cultura (STEVENS & O'DELL, 1974). Entretanto, essa virulência pode ser restaurada pela passagem da ameba em ratos ou pelo subcultivo dos trofozoítos em cultura celular (SCHUSTER, 2002). No subcultivo em cultura celular, os trofozoítos de uma cultura axênica de *Acanthamoeba* são cultivados por um determinado tempo em contato com monocamada de cultura celular, de forma a ocorrer ativação dos fatores de virulência.

Cursons & Brown (1978), em um estudo sobre efeito citopático de *Acanthamoeba* e *Naegleria* em linhagem celular do tipo VERO, demonstraram que há aumento da virulência desses protozoários pela sua exposição em cultura de células.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a virulência de seis isolados de *Acanthamoeba* pelo efeito citotóxico e citopático em relação a procedência das amostras (clínica ou ambiental), ao genótipo (T3, T4 e T5) e após passagem em cultivo em célula MDCK.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar e comparar os efeitos citotóxico e citopático de seis isolados de *Acanthamoeba*, provenientes de amostras clínicas e ambientais, sobre culturas de células MDCK, VERO e CHO;
- Identificar o isolado mais virulento;
- Analisar a diferença de virulência entre os isolados de origens clínica e ambiental e entre os genótipos das amostras;
- Avaliar o efeito da passagem dos isolados em cultura de célula epitelial do tipo MDCK sobre a virulência dos mesmos;
- Analisar a diferença de resultado no uso de linhagens celulares do tipo MDCK, VERO e CHO aplicadas em testes de efeito citotóxico e citopático de trofozoítos de *Acanthamoeba*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

4.1.1 Amostras de *Acanthamoeba*

As amostras utilizadas neste estudo foram caracterizadas por Possamai e colaboradores (2018) e estão disponíveis no laboratório do Núcleo de Estudos de Protozoologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Foram estudados seis isolados de *Acanthamoeba*, sendo três isolados clínicos e três isolados ambientais. Os isolados clínicos foram obtidos a partir de raspados de córnea de pacientes com ceratite amebiana residentes na Região Metropolitana da Grande Vitória – ES. Os isolados ambientais tiveram origem de diversos locais como poeira, água de piscina, torneira e água de inundação, sendo do município de Vitória e da Região Metropolitana da Grande Vitória – ES e um de Manaus/AM (**Quadro 3**). Foram incluídos no estudo amostras de três genótipos diferentes (T3, T4 e T5).

Quadro 3: Relação dos isolados de *Acanthamoeba* que foram utilizados no estudo indicando o seu genótipo e procedência.

Identificação	Genótipo	Procedência do isolado	Local e ano de isolamento	Ano de axenização
Mnus4	T3	Ambiental – saída de torneira	Manaus/AM – 2012	2016
Krt15.DFNL	T3	Clínico – raspado de córnea	Vitória/ES - 2014	2016
I2	T4	Ambiental – água de inundação	Vitória/ES – 2010	2014
Krt12.ROS	T4	Clínico – raspado de córnea	Vitória/ES – 2015	2016
A3P4	T5	Ambiental – poeira	Vitória/ES – 2010	2017
Krt16.PEN	T5	Clínico – raspado de córnea	Vitória/ES - 2013	2016

4.1.2 Amostras de Linhagens de Cultivo Celular

As linhagens celulares utilizadas para o cultivo celular com o objetivo de se realizar os ensaios de citotoxicidade e de citopatogenicidade de trofozoítos de *Acanthamoeba* foram a MDCK, CHO e VERO, todas oriundas do banco de células do Rio do Janeiro (**Quadro 4**).

Quadro 4: Amostras de Linhagens de cultivo celular utilizadas no ensaio de citopatogenicidade de *Acanthamoeba*

Sigla	Nome/Origem	ATCC
MDCK	Célula epitelial de rim de cachorro	ATCC CCL 34
VERO	Célula de rim de macaco verde africano	ATCC CCL 81
CHO	Célula de ovário de hamster chinês	ATCC CCL 61

4.2 AXENIZAÇÃO DOS ISOLADOS

4.2.1 Meio de Cultura para *Acanthamoeba*

A axenização é realizada em meios enriquecidos com nutrientes essenciais que promovem o crescimento do organismo. Para o gênero *Acanthamoeba* é utilizado, mais comumente, o meio PYG (Peptona, Extrato de Levedura e Glicose - SCHUSTER, 2002), sendo este o meio de cultura utilizado neste trabalho. Os meios de cultura estão relacionados no **Anexo 1a**.

4.2.2 Axenização

A axenização de isolados de *Acanthamoeba* consiste na obtenção e manutenção de uma cultura livre de bactérias e de outros microrganismos (VISVESVARA et al., 2008). Para proceder a axenização é necessário que a cultura de trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* seja proveniente de uma única célula. Para isso, é realizada a

clonagem pela técnica de diluição sucessiva, obtendo-se uma população homogênea do isolado de amebas. Com as amostras clonadas, os isolados são, então, cultivados em sistema axênico para avaliação do efeito citopático.

Os cistos, predominantes em culturas com mais de 72 horas, foram recuperados da placa contendo meio ágar soja por lavagem com 5 mL de água destilada esterilizada e transferidos a tubos de cultura axênica (PYG). O sedimento contendo os cistos foi lavado três vezes por centrifugação a 450 x g em água destilada esterilizada e suspenso em 1 mL de água destilada, acrescentando-se enrofloxacino (Baytril®) a uma concentração final de 625 µg/mL. Esta solução contendo os cistos foi mantida overnight a 4 °C e depois os cistos foram lavados novamente por centrifugação, sendo então transferidos a tubos de cultura (120 x 11 mm) com 5 mL de meio PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal (ROWBOTHAM, 1980) e contendo o antibiótico enrofloxacino (Baytril®) na concentração de 5 µg/mL. Os tubos foram incubados à temperatura de 28 °C em estufa microbiológica, em posição inclinada. Após o quinto dia do repique, com a utilização de microscópio óptico invertido, realizou-se a avaliação da cultura para observação do crescimento de trofozoítos (**Anexo 2**).

4.3 CULTIVO DAS LINHAGENS DE CÉLULAS EPITELIAIS DE MAMÍFEROS

4.3.1 Manutenção das linhagens celulares

As células MDCK e VERO foram cultivadas em garrafas de 75 cm³, em Meio Essencial Mínimo de Eagle modificado – DMEM (Dulbeco's), e mantidas em estufa de CO₂ a 5% e a 37°C, com 10% de soro fetal bovino. A linhagem celular CHO foi cultivada em meio de cultura do tipo F-12 (*Ham's F-12 Medium*). Os meios de cultura estão relacionados no **Anexo 1b**.

4.4 EFEITO CITOTÓXICO

Para verificar a virulência pela produção de proteases, os meios condicionados dos isolados de *Acanthamoeba* foram coletados antes e após exposição prévia à linhagem celular em quadruplicada (**Anexo 5**).

4.4.1 Produção de Meio Condicionado

4.4.1.1 Produção de meio condicionado sem passagem prévia de trofozoítos de *Acanthamoeba* à cultura celular de mamífero

Cultura de trofozoítos de *Acanthamoeba* em fase exponencial de crescimento em frascos de 75 cm³, após exposição de 15 minutos em banho de gelo para o destacamento das amebas aderidas no fundo da garrafa de cultura, tiveram seu volume total de meio líquido transferido para frasco de tubo cônico de 15 mL.

Realizou-se a contagem do número total de células/mL em hemocítmetro, ajustando-se o volume para um total de 1×10^7 trofozoítos (**Anexo 3**). Centrifugou-se este volume por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 5 mL de Salina de Page, ressuspendeu-se o sedimento homogeneizando a solução. Centrifugou-se por 10 minutos e repetiu-se esse procedimento de lavagem. Após a lavagem e centrifugação, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 5 mL de meio PYG sem soro bovino fetal (SBF), ressuspendeu-se o sedimento, homogeneizando-se a solução e transferiu-se para frascos de cultura de 25 cm³, mantendo-se em estufa a 28°C por 24 horas.

Após as 24 horas de cultivo, da cultura de 10^7 trofozoítos foi retirado todo o meio líquido e transferido para tubo de 15 mL. Centrifugou-se a solução por 10 minutos. Pipetou-se 3 mL do sobrenadante e filtrou-se em membrana de 0,22 µm estéril para assegurar a ausência de fragmentos celulares. O meio condicionado foi, então, armazenado em alíquotas de 100 µL, em tubo tipo *Eppendorf*, em freezer a -80°C até a utilização para teste de efeito citotóxico (**Anexo 4**).

4.4.1.2 Produção de meio condicionado com prévia exposição de trofozoítos de *Acanthamoeba* à cultura celular de mamífero

Uma quantidade de 1×10^6 trofozoítos de *Acanthamoeba* foi centrifugada e lavada com PBS por três vezes e ressuspendida em 5 mL de DMEM (ou F-12). Feita a homogeneização, transferiu-se a solução para frascos de cultura de 25 cm³ contendo monocamada de células MDCK, que tiveram seu meio de cultura antigo descartado. Manteve-se em estufa de CO₂ a 5% e a 37°C por 24 horas.

Após as 24h, raspou-se do fundo a monocamada celular por completo, recolhendo-se todo o conteúdo do frasco para um frasco do tipo de 15 mL. Centrifugou-se por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se outros 5 mL de DMEM, homogeneizando-se e transferindo para uma nova garrafa de cultura de 25 cm³ contendo monocamada celular de MDCK. Repetiram-se os passos de forma que os trofozoítos ficassem expostos à monocamada celular por três vezes.

Após as três exposições, raspou-se novamente a monocamada de células, transferiu-se o conteúdo para um tubo do tipo de 15 mL, centrifugou-se por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e, para a lavagem, adicionou-se 5 mL de Salina de Page, ressuspendendo-se o sedimento centrifugando-se novamente. A lavagem foi realizada por três vezes.

Terminada a lavagem, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 5 mL de meio de cultura PYG. Homogeneizou-se e transferiu-se para garrafa de cultura de 25 cm³, armazenando-se em estufa a 28°C. A cultura de trofozoítos foi mantida até a sua aderência e deve-se proceder à total retirada de restos de monocamada celular, renovando o PYG. Por fim, para a produção de meio condicionado, realizou-se a contagem de 1×10^7 trofozoítos de *Acanthamoeba* e seguiu-se conforme descrito no item 4.4.1.1 acima.

4.4.2 Distribuição das amostras na placa

Para a realização do teste efeito citotóxico de meios condicionados produzidos por isolados de *Acanthamoeba* com e sem passagem na linhagem de cultura celular, utilizou-se uma placa de 96 poços. Adicionou-se em cada poço 200 µL de meio de cultura DMEM contendo células de mamíferos (MDCK, VERO e CHO - separadamente) e repousou-se a placa em estufa de CO₂ a 5% e a 37°C por 24h para a formação da monocamada celular.

Após 24h, retirou-se de cada poço todo o meio de cultura. Posteriormente, adicionou-se, em cada poço, 100 µL de meio de cultura DMEM e 100 µL do meio condicionado de *Acanthamoeba*, que estava previamente armazenado. Repousou-se a placa em estufa de CO₂ a 5% e a 37°C por 24h. O experimento foi realizado em quadruplicada.

4.4.3 Leitura da placa do ensaio de efeito citotóxico

Após 24h, acrescentou-se 20 µL de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) (M6494 - Life Tech), por três horas e meia. Finalizado este tempo, retirou-se todo o líquido de cada poço e acrescentou-se 100 µL DMSO (dimetilsulfóxido) para que este pudesse solubilizar os cristais de formazan (o MTT é metabolizado por células viáveis, que o reduz a sal de formazan). Protegeu-se a placa da luz e homogeneizou-se em agitador por 10 minutos. Realizou-se a leitura da absorbância da placa em leitor de ELISA, em comprimento de onda de 540 nm e referência 620 nm (KUPCSIK, 2011).

Todos os cálculos de viabilidade celular foram feitos por meio da seguinte equação:

$$\text{Viabilidade} = \frac{(\text{valor da amostra} - \text{valor do branco})}{\text{Controle}} \times 100\%$$

Onde: valor da amostra = absorbância dos meios condicionados incubados com monocamada celular;

Valor do branco = absorbância do meio condicionado;

Valor do controle = absorbância da monocamada celular com PYG.

Para obtenção do valor do percentual de destruição da monocamada de linhagem celular foi realizado o seguinte cálculo:

$$\% \text{ de destruição celular} = 100 - \text{viabilidade celular}$$

4.5 EFEITO CITOPÁTICO

Para a realização do efeito citopático, utilizou-se placa de 48 poços preparada previamente com monocamada de linhagem celular em cada poço. Adicionou-se um volume de 0,5 mL de DMEM (ou F-12) contendo 4×10^4 trofozoítos de *Acanthamoeba* em cada poço com monocamada celular. A placa foi mantida em estufa de CO₂ a 5% e a 37°C. O teste foi realizado em quadruplicada. A dose de 10×10^4 trofozoítos/poço também foi testada (**Anexo 6**).

Os trofozoítos que tiveram prévia exposição sucessiva em linhagem de cultura celular MDCK, e que foram mantidos em cultura, foram testados da mesma forma que os que não tiveram exposição.

O efeito citopático foi analisado, pela microscopia invertida, de acordo com o comportamento da *Acanthamoeba* frente às monocamadas das linhagens celulares dentro de um período de 24h, observando-se a lesão provocada em graus de nível de destruição (0 a 4 graus). A avaliação dos graus foi feita de acordo como nível de destruição da monocamada de cultura celular de mamífero. Graus de efeito citopático:

- Grau 0 – sem efeito citopático, monocamada intacta (0%) (**Figura 5a**);
- Grau 1 – início de efeito citopático, matriz extracelular em fase inicial de degradação, bem como de algumas células (0-25%) (**Figura 5b**);
- Grau 2 – efeito citopático pronunciado (25-50%) (**Figura 5c**);
- Grau 3 – efeito citopático muito pronunciado (acima de 50%) (**Figura 5d**);
- Grau 4 – efeito citopático com completa destruição da monocamada celular (100%).

Para melhor visualizar a destruição da monocamada celular, utilizou-se o corante cristal violeta (WALOCHNIK et al., 2000; KHAN et al., 2000; GONZÁLEZ-ROBLES et al., 2006; GONZÁLEZ-ROBLES et al., 2013).

4.6 ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos utilizou-se do programa IBM SPSS Statistics 20.0.

Inicialmente, para o efeito citotóxico, realizou-se uma análise descritiva, com o intuito de resumir as informações presentes nos dados. A verificação da normalidade foi realizada por meio do teste Shapiro-Wilk e o teste de Bartlett como teste de homogeneidade. A avaliação do percentual de destruição do efeito citotóxico foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis.

A diferença entre as linhagens celulares no efeito citotóxico foi analisada também pelo teste a posteriori de Dunn.

Para comparar o efeito citotóxico antes e após a passagem dos trofozoítos em linhagem celular do tipo MDCK utilizou-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon.

O resultado do efeito citopático foi analisado por meio do teste Qui-quadrado.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO CITOTÓXICO

Os gráficos 1, 2 e 3 apresentam os resultados do percentual de destruição de MDCK, VERO e CHO, obtidos antes e após a passagem dos isolados de trofozoítos de *Acanthamoeba* em linhagem celular do tipo MDCK.

Inicialmente, todas as variáveis independentes “isolado”, “genótipo”, “origem”, “linhagem” foram analisadas para identificar se havia diferença significativa entre os dados sobre a variável dependente “porcentagem de destruição” das monocamadas (**Anexo 7a**).

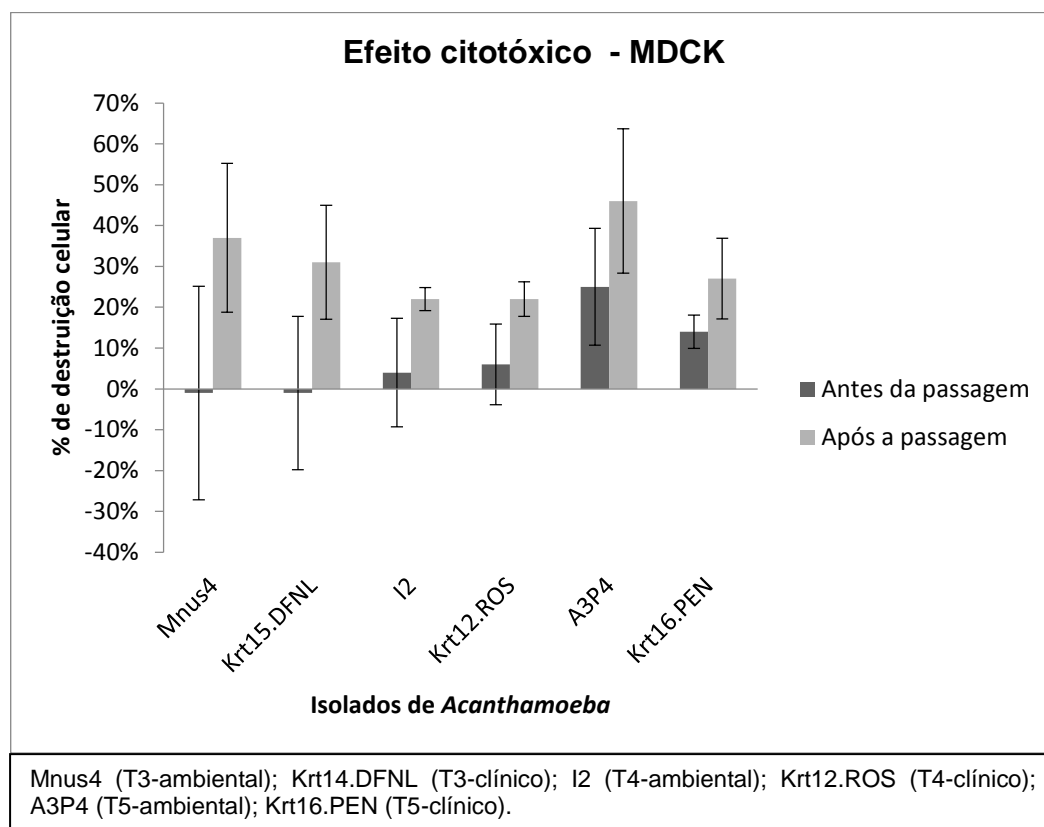


Gráfico 1: Efeito citotóxico dos isolados de *Acanthamoeba* sobre linhagem celular MDCK antes e após a passagem em linhagem celular do tipo MDCK.

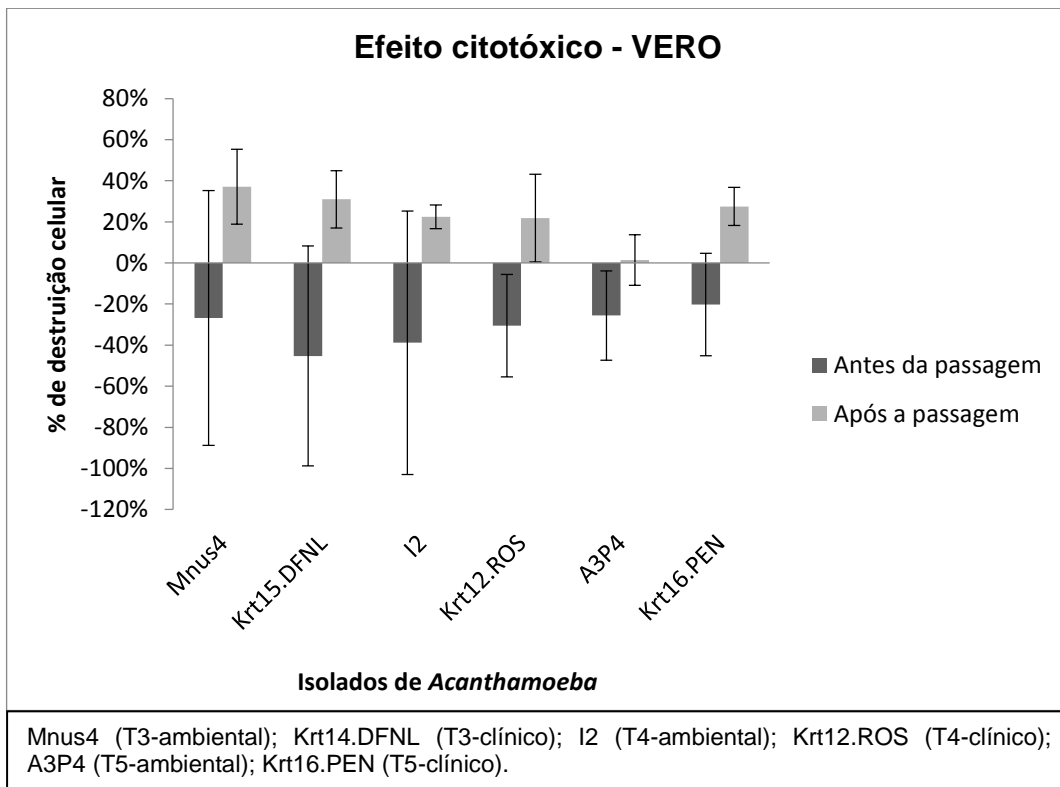


Gráfico 2: Efeito citotóxico dos isolados de *Acanthamoeba* sobre linhagem celular VERO antes e após a passagem em linhagem celular do tipo MDCK.

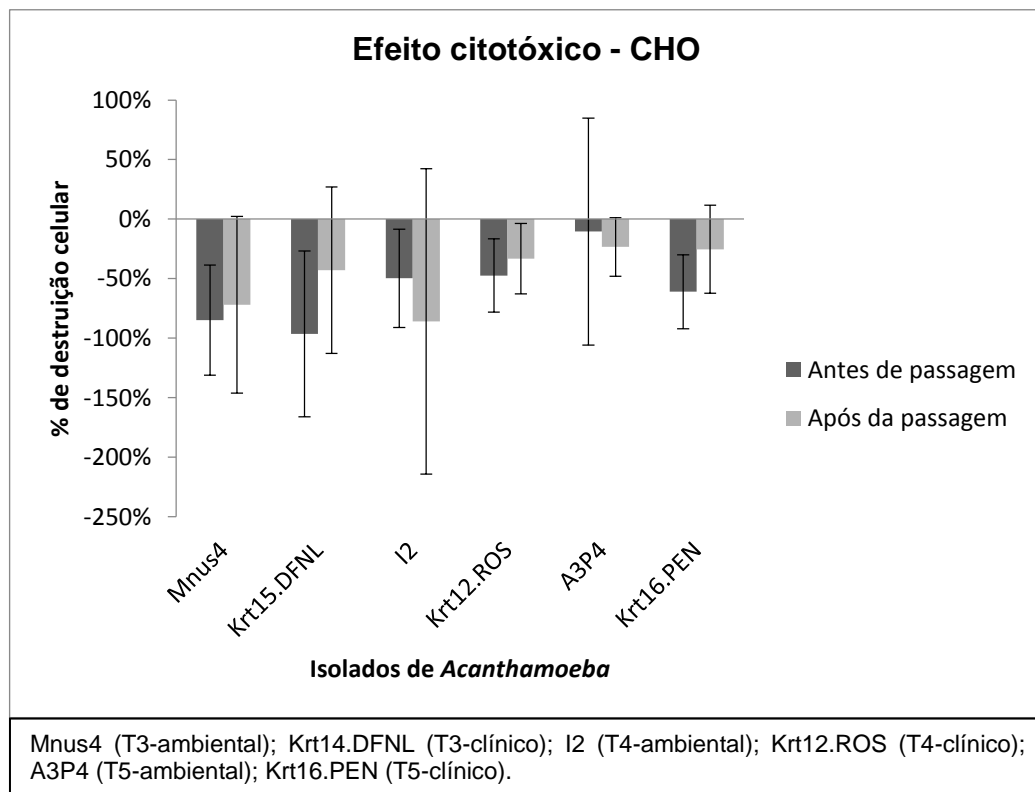


Gráfico 3: Efeito citotóxico dos isolados de *Acanthamoeba* sobre linhagem celular CHO antes e após a passagem em linhagem celular do tipo MDCK.

Entretanto, ao realizar o teste de Kruskal-Wallis identificou-se que somente a variável “Linhagem” apresenta diferença significativa analisando separadamente as categorias “antes” e “após a passagem” em linhagem celular (**Anexos 7a e 7b**). O teste de Dunn confirmou que existiu essa diferença entre as três linhagens antes da passagem, ao comparar os pares de linhagens ($p < 0,05$) (**Gráfico 4**). Aplicando-se novamente o teste de Dunn, porém sobre os dados após a passagem, a comparação entre os pares de linhagens demonstrou que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre CHO e MDCK, entre CHO e VERO, mas MDCK e VERO não diferiram significativamente (**Gráfico 4**), como pode ser visualizado pela proximidade de suas medianas de percentual de destruição celular. Observando-se o **Gráfico 4**, antes da passagem a linhagem que apresentou maior mediana de percentual de destruição da monocamada foi a MDCK, seguida de VERO e CHO.

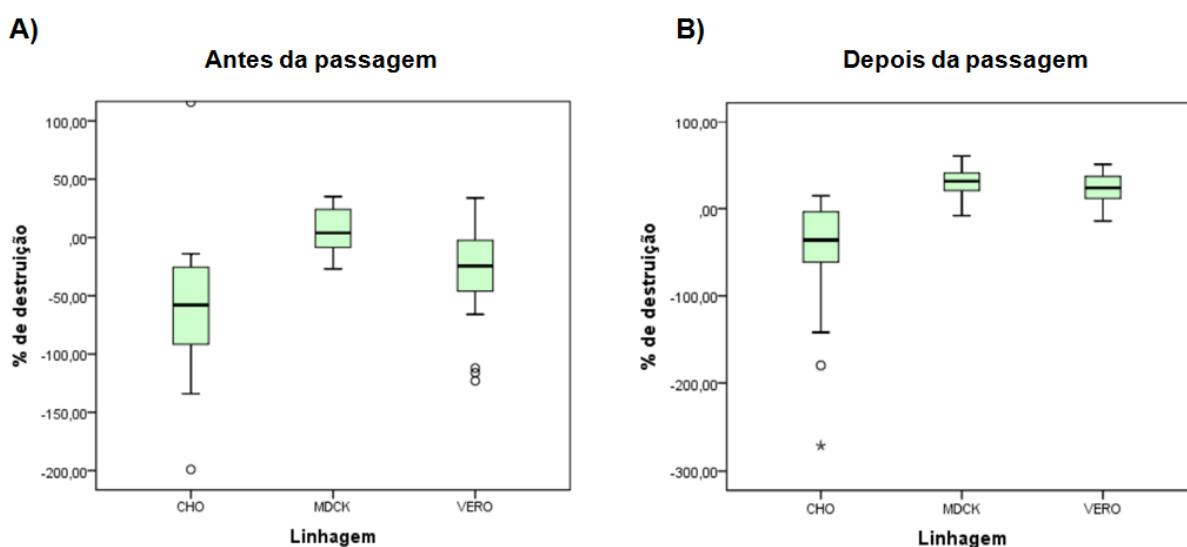


Gráfico 4: Box-plot do efeito citotóxico sobre a variável “linhagem”. A) antes da passagem dos trofozoítos de *Acanthamoeba* em linhagem celular MDCK ($p < 0,05$). B) após a passagem dos trofozoítos de *Acanthamoeba* em linhagem celular MDCK, com $p < 0,05$ para CHO e MDCK, CHO e VERO, e $p > 0,05$ para MDCK e VERO.

Ainda, podemos observar que depois da passagem as linhagens apresentaram um aumento de sua mediana de percentual de destruição da monocamada, ou seja, o nível de destruição promovido pelos isolados de *Acanthamoeba* foi maior após a passagem.

Dessa forma, para comparar estatisticamente os resultados obtidos antes e após a passagem em linhagem celular MDCK, utilizando-se de todos os resultados para cada linhagem, realizou-se o teste de Wilcoxon, o qual identificou a existência de diferença significativa entre esses dados ($p < 0,05$). (**Anexo 7c**). Ou seja, existiu diferença entre os dados “antes da passagem” e “após a passagem”, num contexto geral.

Feito o somatório de dados de cada isolado relativos ao percentual de destruição sobre cada linhagem celular, utilizou-se novamente do teste de Wilcoxon para analisar o comportamento do percentual de destruição antes e após a passagem de cada isolado, cada genótipo, cada linhagem e cada origem, o qual identificou que existiram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre esses dois momentos, sobre todas as variáveis, com algumas exceções, como demonstrado nos **Gráficos 5, 6 e 7** (**Anexo 7c**). As exceções referem-se à não existência de diferença significativa entre I2 e A3P4 ($p > 0,05$).

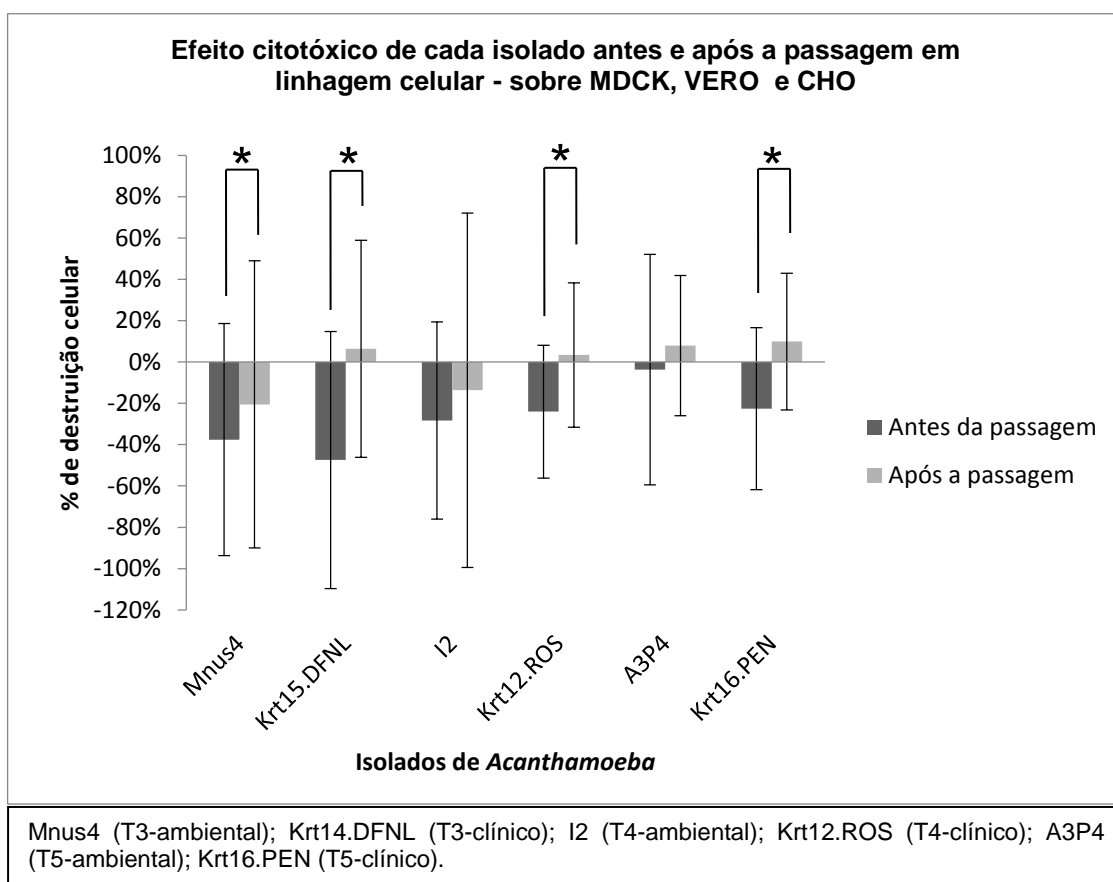


Gráfico 5: Percentual de destruição celular pelo efeito citotóxico de isolados de *Acanthamoeba* antes e após a passagem em cultura celular. * $p < 0,05$

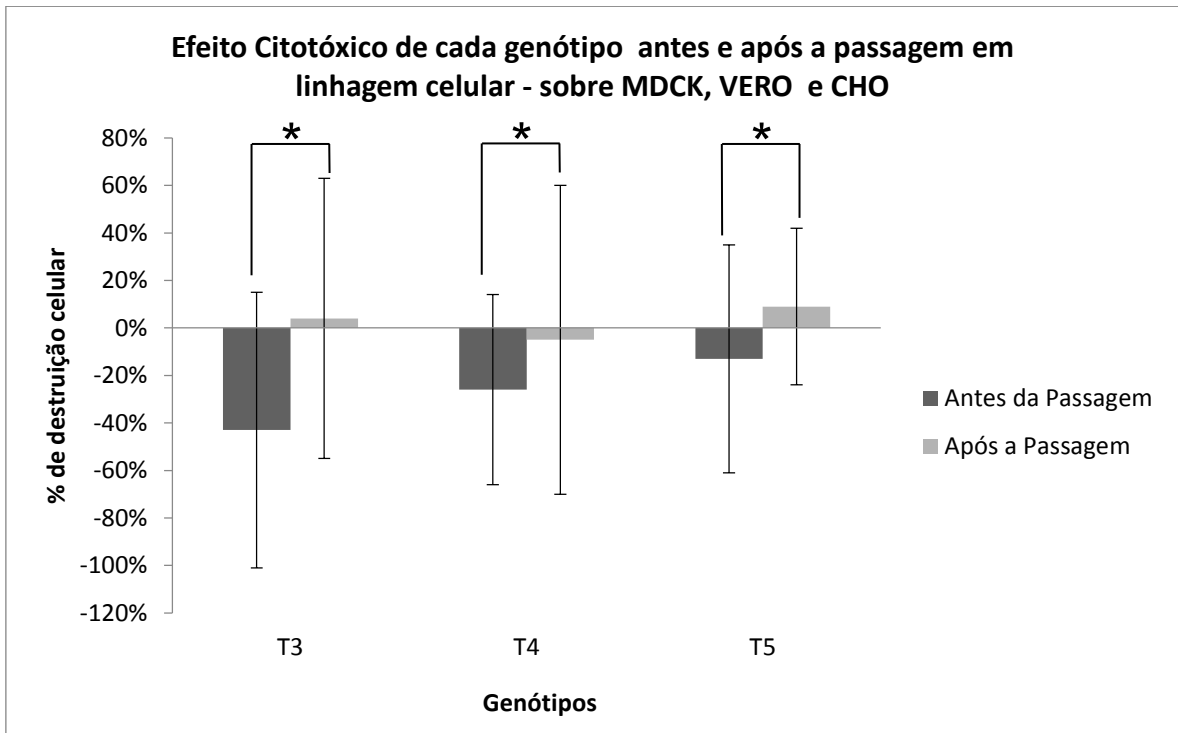


Gráfico 6: Percentual de destruição celular pelo efeito citotóxico de isolados de *Acanthamoeba* de genótipos T3, T4 e T5 antes e após a passagem em cultura celular. * $p < 0,05$.

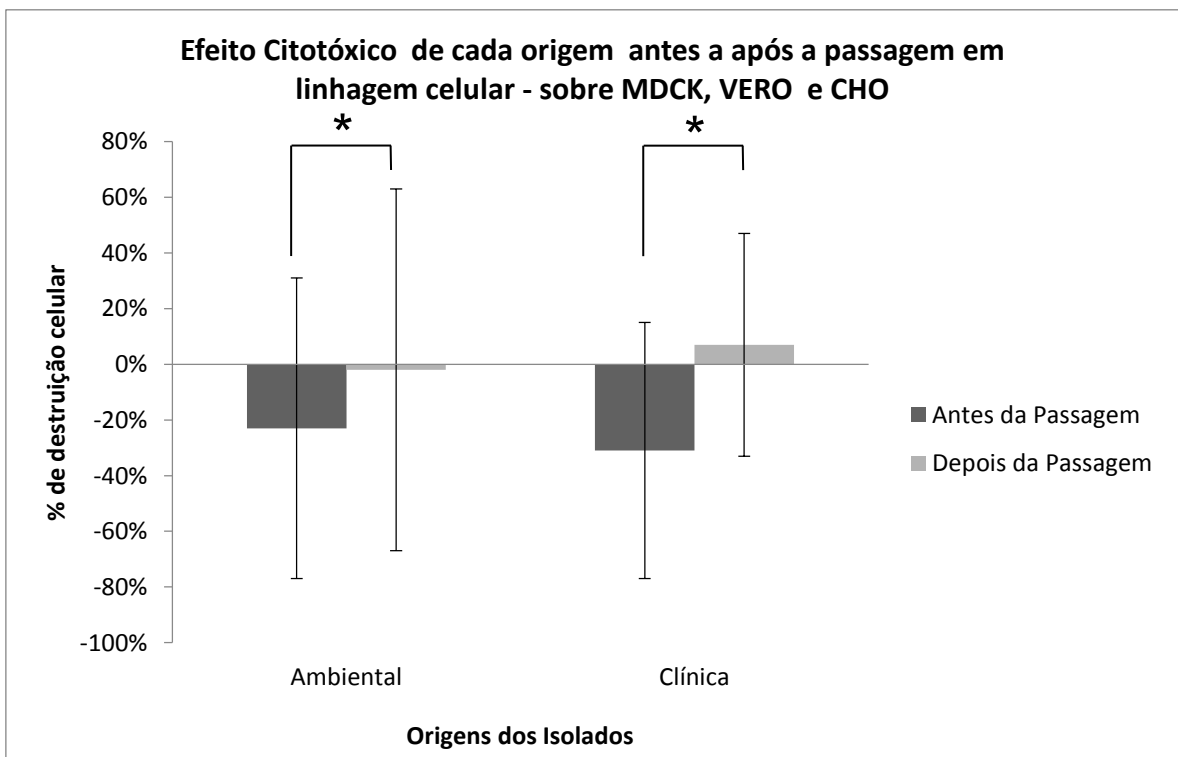


Gráfico 7: Percentual de destruição celular pelo efeito citotóxico de isolados de *Acanthamoeba* de origens ambiental e clínica antes e após a passagem em cultura celular. * $p < 0,05$.

Para analisar se existiu diferença significativa sobre os resultados de cada linhagem “antes” e “após a passagem”, pelo somatório de dados de todos os isolados juntos “antes da passagem” e pelo somatório de dados de todos os isolados juntos “após a passagem”, realizou-se novamente o teste de Wilcoxon, o qual demonstrou que houve diferença significativa ($p < 0,05$) antes e após a passagem sobre a linhagem MDCK e a linhagem VERO, entretanto, a linhagem CHO não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) (Gráfico 6). Não obstante, pelo Gráfico 6 podemos observar que MDCK sofreu efeito citotóxico antes e depois da passagem, VERO sofreu somente após a passagem e CHO não sofreu efeito citotóxico pelos isolados de *Acanthamoeba*. Importante é que foi demonstrado que a passagem dos isolados em linhagem celular MDCK provocou um aumento na destruição das monocamadas.

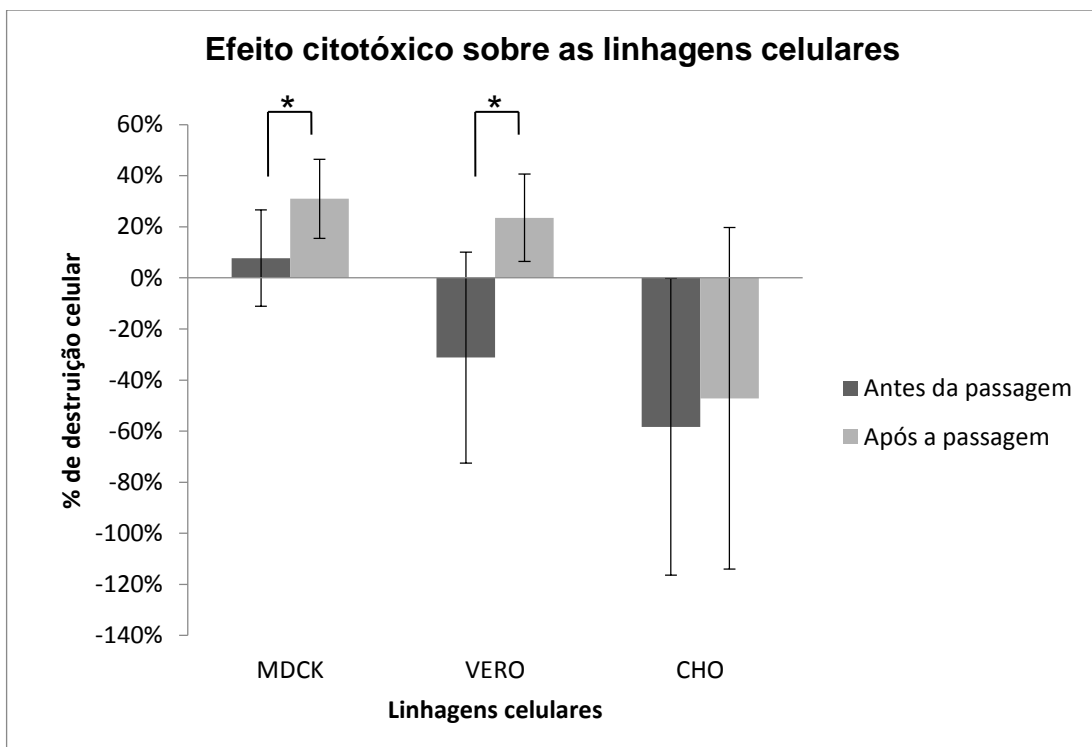


Gráfico 8: Percentual de destruição celular das linhagens celulares pelo efeito citotóxico de isolados de *Acanthamoeba* antes e após a passagem em cultura celular. * $p < 0,05$.

5.2 EFEITO CITOPÁTICO

Os efeitos citopáticos das amostras em análise foram analisados e variações em graus de 0 a 4 (**Figura 5**).

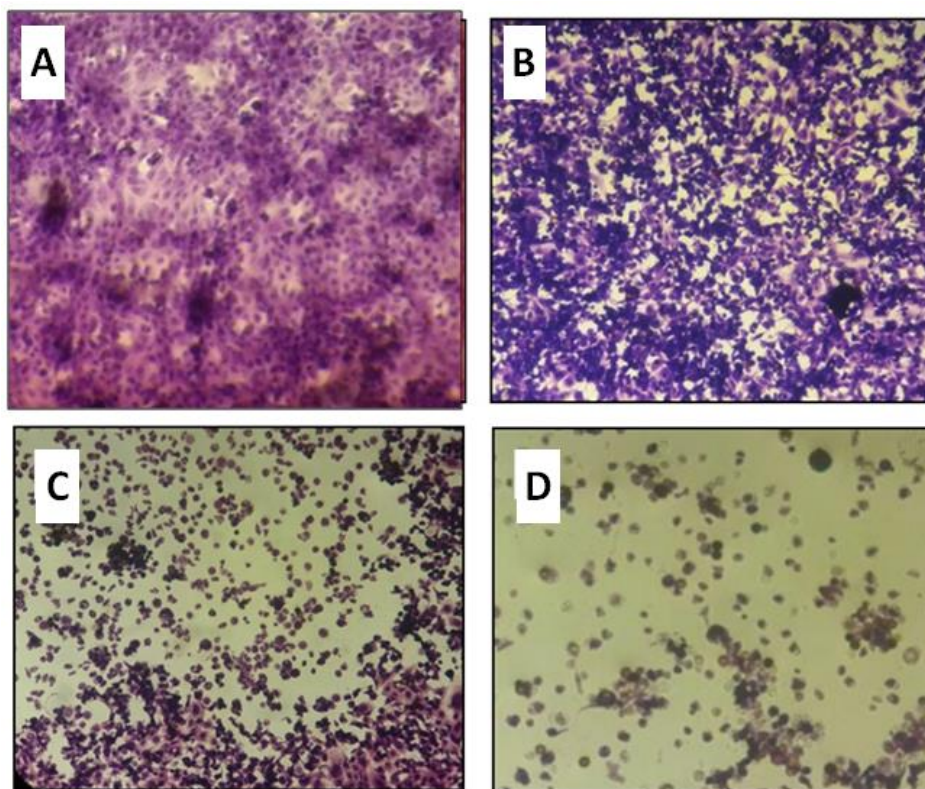


Figura 5: Microscopia invertida. Graus de efeito citopático sobre células do tipo VERO. (A) Controle de VERO. (B) Grau 1 de destruição, amostra Krt12.ROS. (C) Grau 2 de destruição, amostra A3P4. (D) Grau 3 de destruição, amostra A3P4. (Aumento de 10x). Fonte: autora.

Dos testes de efeito citopático realizados com trofozoítos de *Acanthamoeba* numa quantidade inicial de 4×10^4 trofozoítos/poço e que não tiveram exposição prévia à monocamada celular de mamífero (**Tabela 1**) apenas uma placa apresentou efeito citopático nas células do tipo MDCK. Nas células do tipo VERO, somente uma amostra em uma placa apresentou efeito. Ainda, ao utilizar cultura celular do tipo CHO, foi demonstrado efeito citopático em todas as placas, com variados resultados entre as amostras.

Ao aumentar a dose inicial de trofozoítos/poço para 10×10^4 trofozoítos/poço, mantendo-se a leitura da exposição em 24h, não foi observado efeito citopático em

células do tipo MDCK. Entretanto, nas células do tipo VERO, das quatro placas analisadas, a amostra Krt12.ROS (T4) apresentou efeito citopático em duas placas e a amostra A3P4 (T5) em uma placa. As células do tipo CHO sofreram efeito citopático em todas as placas, com todas as amostras, com exceção da amostra I2 (T4), que não houve efeito em uma placa.

Ao realizar a passagem prévia das amostras de *Acanthamoeba* em linhagem do tipo MDCK, no intuito de reativar a virulência das amostras de trofozoítos, a linhagem do tipo MDCK não apresentou efeito citopático com inóculo inicial de 4×10^4 trofozoítos/poço, entretanto, ao aumentar para 10×10^4 trofozoítos/poço, apenas a amostra Krt16.PEN (T5) apresentou efeito citopático em somente uma placa e um poço, em grau 1. Com dose de 4×10^4 trofozoítos/poço, a linhagem VERO não apresentou efeito citopático e ao aumentar o inóculo para 10×10^4 trofozoítos/poço, houve efeito em todas as placas. A linhagem CHO apresentou efeito em todas as placas nas duas concentrações iniciais de trofozoítos adicionados após prévio contato com células do tipo MDCK.

Cada amostra teve variações quanto ao grau de efeito citopático atingido sobre a monocamada de cultura celular e em quantidade de poços que cada grau ocorreu, sendo então calculado o percentual de poços encontrados (de um total de 16 poços lidos) para cada isolado, antes e após a passagem, como demonstrado pelas **Tabelas 1 e 2.**

Tabela 1: Percentual do total de poços encontrados com cada grau de efeito citopático de isolados de *Acanthamoeba*, de acordo com o tamanho do inóculo de trofozoítos antes da passagem em linhagem celular MDCK

Linhagem	Isolado	Grau de efeito citopático - % poços encontrados (nº de poços encontrados)				
		Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
1) MDCK						
Inóculo de 4 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt15.DFNL (T3)	93,75% (15)	0	6,25% (1)	0	0
	I2 (T4)	75% (12)	0	25% (4)	0	0
	Krt12.ROS (T4)	75% (12)	0	25% (4)	0	0
	A3P4 (T5)	75% (12)	0	0	25% (4)	0
	Krt16.PEN (T5)	75% (12)	0	0	25% (4)	0
10 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt15.DFNL (T3)	100% (16)	0	0	0	0
	I2 (T4)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt12.ROS (T4)	100% (16)	0	0	0	0
	A3P4 (T5)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt16.PEN (T5)	100% (16)	0	0	0	0
2) VERO						
Inóculo de 4 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt15.DFNL (T3)	93,75% (15)	6,25% (1)	0	0	0
	I2 (T4)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt12.ROS (T4)	100% (16)	0	0	0	0
	A3P4 (T5)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt16.PEN (T5)	100% (16)	0	0	0	0
Inóculo de 10 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt15.DFNL (T3)	100% (16)	0	0	0	0
	I2 (T4)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt12.ROS (T4)	68,75% (11)	6,25% (1)	12,5% (2)	12,5% (2)	0
	A3P4 (T5)	87,5% (14)	12,5% (2)	0	0	0
	Krt16.PEN (T5)	100% (16)	0	0	0	0
3) CHO						
Inóculo de 4 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	37,5% (6)	25% (4)	12,5% (2)	25% (4)	0
	Krt15.DFNL (T3)	0	87,5% (14)	6,25% (1)	6,25% (1)	0
	I2 (T4)	75% (12)	18,75% (3)	6,25% (1)	0	0
	Krt12.ROS (T4)	0	6,25% (1)	43,75% (7)	50% (8)	0
	A3P4 (T5)	0	6,25% (1)	37,5% (6)	56,25% (9)	0
	Krt16.PEN (T5)	0	18,75% (3)	56,5% (9)	25% (4)	0
Inóculo de 10 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	6,25% (1)	81,25% (13)	12,5% (2)	0	0
	Krt15.DFNL (T3)	31,25% (5)	68,75% (11)	0	0	0
	I2 (T4)	37,5% (6)	56,25% (9)	6,25% (1)	0	0
	Krt12.ROS (T4)	0	6,25% (1)	31,25% (5)	62,5% (10)	0
	A3P4 (T5)	0	0	56,25% (9)	43,75% (7)	0
	Krt16.PEN (T5)	0	18,75% (3)	56,25% (9)	25% (4)	0

Mnus4 (T3-ambiental); Krt14.DFNL (T3-clínico); I2 (T4-ambiental); Krt12.ROS (T4-clínico); A3P4 (T5-ambiental); Krt16.PEN (T5-clínico).

Tabela 2: Percentual do total de poços encontrados com cada grau de efeito citopático de isolados de *Acanthamoeba*, de acordo com o tamanho do inoculo de trofozoítos após a passagem em linhagem celular MDCK.

Linhagem	Isolado	Grau de efeito citopático - % poços encontrados (nº de poços encontrados)				
		Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
4) MDCK						
Inóculo de 4 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt15.DFNL (T3)	100% (16)	0	0	0	0
	I2 (T4)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt12.ROS (T4)	100% (16)	0	0	0	0
	A3P4 (T5)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt16.PEN (T5)	100% (16)	0	0	0	0
Inóculo de 10 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt15.DFNL (T3)	100% (16)	0	0	0	0
	I2 (T4)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt12.ROS (T4)	100% (16)	0	0	0	0
	A3P4 (T5)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt16.PEN (T5)	93,75% (15)	6,25% (1)	0	0	0
5) VERO						
Inóculo de 4 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt15.DFNL (T3)	100% (16)	0	0	0	0
	I2 (T4)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt12.ROS (T4)	100% (16)	0	0	0	0
	A3P4 (T5)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt16.PEN (T5)	100% (16)	0	0	0	0
Inóculo de 10 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	56,25% (9)	12,5% (2)	31,25%(5)	0	0
	Krt15.DFNL (T3)	31,25% (5)	43,75% (7)	12,5% (2)	12,5% (2)	0
	I2 (T4)	100% (16)	0	0	0	0
	Krt12.ROS (T4)	25% (4)	68,75%(11)	6,25% (1)	0	0
	A3P4 (T5)	0	25% (4)	56,25%(9)	18,75%(3)	0
	Krt16.PEN (T5)	12,5% (2)	56,25% (9)	31,25%(5)	0	0
6) CHO						
Inóculo de 4 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	25% (4)	12,5% (2)	43,75%(7)	18,75%(3)	0
	Krt15.DFNL (T3)	68,75% (11)	25% (4)	6,25% (1)	0	0
	I2 (T4)	43,75% (7)	6,25% (1)	37,5% (6)	12,5% (2)	0
	Krt12.ROS (T4)	0	12,5% (2)	50% (8)	37,5% (6)	0
	A3P4 (T5)	0	18,75% (3)	37,5% (6)	43,75%(7)	0
	Krt16.PEN (T5)	18,75% (3)	37,5% (6)	25% (4)	37,5% (6)	0
Inóculo de 10 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	18,75% (3)	36,5% (6)	37,5% (6)	18,75%(3)	0
	Krt15.DFNL (T3)	36,5% (6)	56,25% (9)	0	6,25% (1)	0
	I2 (T4)	12,5% (2)	56,25% (9)	25% (4)	6,25% (1)	0
	Krt12.ROS (T4)	0	31,25% (5)	56,25%(9)	12,5% (2)	0
	A3P4 (T5)	0	31,25% (5)	37,5% (6)	31,25%(5)	0
	Krt16.PEN (T5)	0	37,5% (6)	25% (4)	37,5% (6)	0

Mnus4 (T3-ambiental); Krt14.DFNL (T3-clínico); I2 (T4-ambiental); Krt12.ROS (T4-clínico); A3P4 (T5-ambiental); Krt16.PEN (T5-clínico).

Considerando as três linhagens, os isolados de *Acanthamoeba* apresentaram variações nas proporções da quantidade de poço de cada grau de efeito citopático encontrado (**Tabela 3**).

Tabela 3: Percentual total de poços com variações em graus de efeito citopático de isolados de *Acanthamoeba* sobre linhagens celulares

Isolado de <i>Acanthamoeba</i>	Total de poços encontrados para cada grau de Efeito Citopático em todas as linhagens celulares				
	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Mnus4 (T3)	70,31% (135)	14,06% (27)	11,46% (22)	4,16% (8)	0
Krt15.DFNL (T3)	71,35% (137)	23,96% (46)	2,60% (5)	2,08% (4)	0
I2 (T4)	78,65% (151)	11,46% (22)	8,33% (16)	1,56% (3)	0
Krt12.ROS (T4)	55,73% (107)	10,94% (21)	18,75% (36)	14,58% (28)	0
A3P4 (T5)	55,21% (106)	7,81% (15)	18,75% (36)	18,23% (35)	0
Krt16.PEN (T5)	58,33% (112)	15,10% (29)	14,06% (27)	12,5% (24)	0

Mnus4 (T3-ambiental); Krt14.DFNL (T3-clínico); I2 (T4-ambiental); Krt12.ROS (T4-clínico); A3P4 (T5-ambiental); Krt16.PEN (T5-clínico).

A linhagem MDCK só sofreu efeito citopático na dose de 4×10^4 trofozoítos/poço e antes da passagem, com exceção da ocorrência de efeito com a dose 10×10^4 trofozoítos/poço e depois da passagem de Krt16.PEN (T5-clínico) em linhagem celular. VERO sofreu efeito citopático antes e após a passagem na dose de 10×10^4 trofozoítos/poço, com exceção de Krt15.DFNL (T3-clínico) que foi capaz de causar efeito na menor dose antes da passagem. A linhagem CHO sofreu efeito citopático em todos os tamanhos de inóculo e antes e após a passagem (**Quadro 5**).

Quadro 5: Relação de efeito citopático de isolados de *Acanthamoeba* sobre linhagens celulares MDCK, VERO e CHO antes e após passagem em MDCK e com inóculos de tamanhos diferentes.

Exposição	Tamanho do inóculo (trofozoítos/poço)	Isolado	Cultura celular		
			MDCK	VERO	CHO
Antes da passagem em MDCK	Inóculo de 4 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	-	-	+
		Krt15.DFNL (T3)	+	+	+
		I2 (T4)	+	-	+
		Krt12.ROS (T4)	+	-	+
		A3P4 (T5)	+	-	+
		Krt16.PEN (T5)	+	-	+
	Inóculo de 10 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	-	-	+
		Krt15.DFNL (T3)	-	-	+
		I2 (T4)	-	-	+
		Krt12.ROS (T4)	-	+	+
		A3P4 (T5)	-	+	+
		Krt16.PEN (T5)	-	-	+
Após a passagem em MDCK	Inóculo de 4 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	-	-	+
		Krt15.DFNL (T3)	-	-	+
		I2 (T4)	-	-	+
		Krt12.ROS (T4)	-	-	+
		A3P4 (T5)	-	-	+
		Krt16.PEN (T5)	-	-	+
	Inóculo de 10 x 10 ⁴ trofozoítos/poço	Mnus4 (T3)	-	+	+
		Krt15.DFNL (T3)	-	+	+
		I2 (T4)	-	-	+
		Krt12.ROS (T4)	-	+	+
		A3P4 (T5)	-	+	+
		Krt16.PEN (T5)	+	+	+

(-) Efeito Citopático ausente

(+) Efeito Citopático presente

Mnus4 (T3-ambiental); Krt14.DFNL (T3-clínico); I2 (T4-ambiental); Krt12.ROS (T4-clínico); A3P4 (T5-ambiental); Krt16.PEN (T5-clínico).

Para analisar os resultados do efeito citopático foi aplicado o Teste Qui-Quadrado (**Anexo 8**) com o objetivo de verificar a existência de diferença entre as proporções das variáveis nos determinados graus de efeito citopático. O teste mostrou que em todas as variáveis (isolado, tamanho do inóculo, genótipo, origem e linhagem), as proporções diferem significativamente ($p < 0,05$).

5.2.1 Virulência entre os isolados

Para possibilitar a análise da diferença da virulência entre os isolados, foi contabilizado a soma do total de poços em que o efeito citopático apresentou graus 3 e 4 (maiores graus de virulência) de destruição sobre as linhagens celulares em

relação ao total de poços com ausência de efeito citopático, grau 0 (menor grau de virulência), de cada um dos isolados (**Tabela 4**) (**Anexo 8**).

$$N = \frac{\text{n}^\circ \text{ de poços com grau 3} + \text{n}^\circ \text{ de poços com grau 4}}{\text{n}^\circ \text{ de poços com grau 0}}$$

Tabela 4: Proporção da ocorrência de poços com maior e menor grau de efeito citopático entre isolados de *Acanthamoeba* antes e após a passagem em cultura de célula MDCK

Genótipo	Proporção de poços com graus 3 e 4/menor grau de efeito citopático
Mnus4 (T3-ambiental)	0,059
Krt15.DFNL (T3-clínico)	0,029
I2 (T4-ambiental)	0,020
Krt12.ROS (T4-clínico)	0,262
A3P4 (T5-ambiental)	0,330
Krt16.PEN (T5-clínico)	0,229

Assim, o isolado com maior virulência é o A3P4, seguido de Krt12.ROS, Krt16.PEN, Mnus4, Krt15.DFNL e I2, pois quanto maior o número de vezes em que se teve os graus 3 e 4 e menor o número em que se teve ausência de efeito citopático, maior é a virulência do isolado, uma vez que a medida que o grau de efeito citopático aumenta, maior é o potencial de destruição celular da ameba.

5.2.2 Virulência entre genótipos diferentes

Do total de 384 poços lidos para cada genótipo, o genótipo T3 apresentou um número total de 3,1% (12) poços apresentando grau 3 de efeito citopático, o genótipo T4 8,1% (31) poços e o genótipo T5 15,6% (60) poços. Portanto, em tem-se a seguinte ordem decrescente de virulência baseado no efeito citopático: genótipo T5, genótipo T4 e genótipo T3 (**Tabela 5**) (**Anexo 8**).

Tabela 5: Total de poços com grau 3 de efeito citopático de genótipos T3, T4 e T5 de *Acanthamoeba*.

Genótipo	Total de poços com grau 3 de efeito citopático – % (poços)
T3	3,1% (12)
T4	8,1% (31)
T5	15,6% (60)

5.2.3 Virulência entre amostras de diferentes origens

O teste Qui-quadrado demonstrou que existiu diferença significativa entre as proporções de graus efeito citopático encontrados comparando-se amostras clínicas e ambientais. Para diferenciar a virulência entre os isolados clínicos e ambientais, foi contabilizado o total de poços em que o efeito citopático apresentou um grau 3 de destruição sobre as linhagens celulares sobre o total geral de 576 poços lidos para cada origem de isolado (**Tabela 6**) (**Anexo 8**).

Tabela 6: Total de poços com grau 3 de efeito citopático de amostras ambientais e clínicas de trofozoítos de *Acanthamoeba*

Origem da Amostra	Poços com grau 3 de efeito citopático (%)
Ambiental	46 (8,0%)
Clínica	57 (9,9%)

Dessa forma, as amostras ambientais apresentaram virulência menor do que as amostras clínicas, entretanto os valores se aproximam.

5.2.4 Susceptibilidade da linhagem celular

Para identificar susceptibilidade das linhagens celulares ao efeito citopático por trofozoítos de *Acanthamoeba*, foi considerado o número total de presença de efeito citopático (graus 1, 2, 3 e 4) observado num total de 384 poços lidos para cada linhagem celular.

A linhagem MDCK teve um total de 4,69% (18) poços em que houve efeito citopático, seguido de 17,71% (68) de VERO e 83,59% (321) de CHO. Logo, pode-se considerar que a linhagem CHO é a mais susceptível ao efeito citopático, seguida por VERO e MDCK, respectivamente (**Tabela 7**) (**Anexo 8**).

Tabela 7: Número de poços apresentando efeito citopático sobre as linhagens celulares MDCK, VERO e CHO.

Linhagem celular	Total de poços com presença de efeito citopático (%)
MDCK	4,69 % (18)
VERO	17,71% (68)
CHO	83,59 % (321)

Ainda, de acordo com o teste Qui-Quadrado (**Anexo 8**) a linhagem CHO destacou-se das demais por possuir um comportamento diferente. Enquanto as outras apresentaram baixas porcentagens a medida que o grau foi aumentando, a linhagem CHO apresentou crescente aumento.

A relação entre os efeitos citotóxico e citopático, no que diz respeito a quais linhagens celulares são susceptíveis aos isolados de *Acanthamoeba* pode ser vista no **Quadro 6**.

Quadro 6: Relação de susceptibilidade de linhagens celulares MDCK, VERO e CHO ao efeitos citotóxico e citopático de isolados de *Acanthamoeba* utilizando dois inóculos de trofozoítos de ameba (4×10^4 e 10×10^4 amebas por poço)

Isolado	Efeito Citotóxico		Efeito Citopático			
	Antes da passagem	Após a Passagem	Antes da passagem		Após a Passagem	
			4×10^4 (ameba/poço)	10×10^4 (ameba/poço)	4×10^4 (ameba/poço)	10×10^4 (ameba/poço)
Mnus4 (T3-Ambiental)	-	MDCK VERO	CHO	CHO	CHO	VERO CHO
Krt15.DFNL (T3-clínico)	-	MDCK VERO	MDCK VERO CHO	CHO	VERO CHO	VERO CHO
I2 (T4-ambiental)	MDCK	MDCK VERO	MDCK CHO	CHO	CHO	VERO CHO
Krt12.ROS (T4-clínico)	MDCK	MDCK VERO	MDCK CHO	VERO CHO	CHO	VERO CHO
A3P4 (T5-ambiental)	MDCK	MDCK	MDCK CHO	VERO CHO	CHO	VERO CHO
Krt16.PEN (T5-clínico)	MDCK	MDCK VERO	MDCK CHO	CHO	CHO	MDCK VERO CHO

6 DISCUSSÃO

Devido à gravidade das infecções causadas por *Acanthamoeba*, nos estudos sobre *Acanthamoeba* existe a necessidade de se determinar de forma rápida e precisa se um isolado é patogênico ou não patogênico, bem como a distinção dos níveis de virulência entre os isolados e, conseqüentemente, de seus genótipos. Entretanto, os modelos amplamente aplicados nos estudos e que seguem parâmetros morfológicos simples e características tolerância fisiológica da ameba não fornecem qualquer medida de patogenicidade, sendo utilizados como indicadores de potencial patogênico (CURSONS & BROWN, 1978; DE JONCKHEERE, 1980; BADENOCH et al., 1995).

Uma das dificuldades encontradas para análise de virulência de uma estirpe é que o cultivo prolongado leva a perda na virulência da ameba (MAZUR & HADAS, 1994). Assim, uma das opções mais utilizadas para a avaliação da patogenicidade e virulência dos isolados de *Acanthamoeba* é por meio de testes de efeito citopático e citotóxico em cultura celular (CURSONS & BROWN, 1978; DE JONCKHEERE, 1980; REN & WU, 2010), além disso, existe a possibilidade de promover a reativação da virulência da ameba por meio da sua passagem em linhagem de cultura celular (SCHUSTER, 2002).

Vários fatores são estudados como sendo determinantes ou ao menos influenciadores sobre o efeito citopático de *Acanthamoeba* (DA ROCHA-AZEVEDO & SILVA-FILHO, 2007; CAO et. al., 2008; SARAVANAN et al., 2008; DA ROCHA-AZEVEDO et al., 2009; KÖHSLER et al., 2009). Esses fatores incluem a virulência da ameba, a concentração e a idade do inóculo, a temperatura de incubação (STEVENS & O'DELL, 1974), o tempo de incubação (LARKIN et al., 1991) e a susceptibilidade do tipo de monocamada celular.

No presente trabalho, considerando que os estudos de virulência descritos na literatura são pouco padronizados, testamos a virulência de seis isolados de três genótipos diferentes, de procedência clínica e ambiental por meio de duas técnicas (efeito citotóxico e efeito citopático), em três linhagens diferentes de cultivo celular. Também avaliamos os isolados antes e após exposição a cultura de células de

mamíferos para verificar se houve restauração da virulência após passagem em cultivo celular.

Nos testes de efeito citotóxico avaliou-se a destruição das linhagens celulares pela ação dos meios condicionados de trofozoítos de *Acanthamoeba*. Alguns estudos demonstraram que trofozoítos de *Acanthamoeba* produzem fatores líticos, que constituem o meio condicionado, provocando a lise de células de melanoma e de células epiteliais da córnea pela apoptose (PIDHERNEY et al, 1993; ALIZADEH et al, 1994).

Nossos resultados demonstram que em relação ao efeito citotóxico, a linhagem MDCK (epitelial) foi mais susceptível ao meio condicionado, seguida da célula VERO e a menos susceptível foi a linhagem CHO. O fato de VERO e CHO serem células do tipo fibroblasto (FRESHNEY, 2005), faz com que elas possuam, portanto, características distintas do tecido epitelial (MDCK), o que poderia explicar o motivo pelo qual elas foram menos sensíveis ao meio condicionado do que a MDCK. Semelhantemente aos nossos resultados, dados apresentados por Omaña-molina e colaboradores (2010) demonstraram que o meio condicionado produzido por *Acanthamoeba castellanii* promoveu efeito citotóxico apenas na camada mais superficial da córnea humana, constituído por tecido epitelial, mas não foi suficiente para explicar a invasão em camadas mais profundas e sugeriram que o contato direto do trofozoíto garantindo a ação mecânica e a fagocitose das células da córnea durante o processo de invasão é mais importante do que os fatores diretos de virulência independentes de contato. Outro dado importante descrito por Omaña-molina e colaboradores (2010) foi que córneas de Hamster incubadas com meio condicionado apresentaram vacuolização citoplasmática e ruptura das junções celulares epiteliais.

Os achados de Chávez-munguía e colaboradores (2016) demonstraram a capacidade de meios condicionados em interromper essas junções celulares, com melhor desempenho das culturas de trofozoítos que tiveram passagem celular do que as culturas de trofozoítos a longo prazo, que, no caso, não produziram efeito citotóxico. Esses dados corroboram os resultados do efeito citotóxico encontrados neste estudo, em que a linhagem MDCK foi a linhagem mais susceptível à alteração

da cultura celular pelos meios condicionados, tanto antes como após a passagem dos trofozoítos em linhagem celular, sendo mais susceptível neste último caso.

A lesão sobre VERO utilizando meio condicionado condiz com os achados de Visvesvara & Balamuth (1975), onde filtrados de *Acanthamoeba* cultivada axenicamente foram capazes de produzir efeito citotóxico em células do tipo VERO, entretanto, essa susceptibilidade aqui demonstrada só aconteceu após a passagem dos trofozoítos em linhagem celular, sendo VERO antes resistente. Sugerimos que, embora uma linhagem celular seja mais predisponente a um tipo de fator direto de virulência, estirpes mais virulentas de *Acanthamoeba* tendem a romper esses fatores que estariam ligados aos hospedeiros. A linhagem CHO demonstrou um aumento da susceptibilidade após a passagem dos trofozoítos, entretanto, isso não foi capaz de provocar destruição da monocamada celular, somente ocorrendo a diminuição do crescimento da linhagem.

Deve-se verificar se o fator tempo de incubação interfere no resultado, com um período inferior ou superior a 24h, tendo em vista a diversidade desse fator encontrada na literatura. É provável que quanto maior o tempo de incubação, maior é o efeito citotóxico sobre a monocamada de linhagem celular.

Importante, também, é a determinação da concentração de protease secretada no meio condicionado que cada isolado de *Acanthamoeba* produziu, uma vez que o efeito citotóxico é diretamente proporcional a essa concentração, quanto mais virulento o isolado uma maior quantidade de protease ele secreta. Além disso, a análise do perfil protéico do meio condicionado é capaz de identificar isolados patogênicos (KHAN et al., 2000; SISSONS et al., 2006;).

O teste de efeito citotóxico demonstrou sofrer influência somente do tipo de linhagem celular de mamífero utilizada, não importando o isolado utilizado, o seu genótipo ou origem, havendo necessidade de atenção especial à escolha da linhagem para se dar prosseguimento em pesquisas. Porém, por meio do efeito citopático foi possível estabelecer e identificar melhor os parâmetros de ordem de virulência entre os microrganismos, bem como de linhagem celular que melhor responde ao experimento.

A utilização de somente um tipo de linhagem celular de mamífero nesses testes pode gerar resultados diferentes quanto à patogenicidade do isolado e, especialmente, sobre o grau de virulência do mesmo. Um isolado pode ser mais ou menos virulento de acordo com a linhagem celular empregada no ensaio de efeito citotóxico, ou até mesmo não apresentar patogenicidade para aquela linhagem.

O teste de efeito citotóxico sugere que existem fatores do hospedeiro que interferem diretamente na patogênese da infecção por *Acanthamoeba*, podendo o tecido-alvo ter resistência e susceptibilidade relativas e inerentes ao seu perfil.

A virulência dos isolados também foi avaliada por meio do teste de efeito citopático. Uma das explicações prováveis que explicariam os danos em célula alvo, efeito citopático, causados por *Acanthamoeba* seria pela produção de proteínas formadoras de poros, mediado por citólise direta ou por apoptose dose-dependente (STOPAK et al., 1991; ALIZADEH et al., 1994). Outras formas de provocar a destruição celular são pelos mecanismos dependentes de contato, com o processo de adesão e invasão por acontapódios e a fagocitose de células-alvo por vesículas endocíticas (CHÁVEZ-MUNGUÍA et al., 2016). Estudos de Stopak e colaboradores (1991) sugeriram que os trofozoítos de *Acanthamoeba* dependem do componente celular da córnea como substrato para o crescimento, postulando que a ameba se alimenta diretamente da camada de células epiteliais densas, causando ruptura que eventualmente proporciona acesso ao estroma corneano para os organismos, nos testes de efeito citopático a ameba está em contato direto com os componentes celulares das linhagens.

A análise estatística dos nossos resultados do efeito citopático demonstrou que todas as variáveis utilizadas neste trabalho (tipo de isolado, tamanho do inóculo, genótipo, origem do isolado e linhagem celular) foram capazes provocar alterações dos resultados a medida em que os graus de efeito citopático foram aumentando.

De fato, o teste de efeito citopático, por haver contato direto dos trofozoítos com as linhagens celulares, demonstrou sofrer influência do tipo de isolado, do genótipo utilizado e do tamanho do inóculo utilizado (dose). O contato direto do protozoário com a célula-alvo faz com que os fatores de virulência da ameba possam ser

ativados de acordo com a barreira encontrada. Desse contato direto, a ameba é capaz de promover o processo de adesão, o primeiro passo da invasão tecidual (KHAN, 2003) e, a partir desse processo, ocorre o reconhecimento de glicoproteínas de células hospedeiras ou glicolípídeos, ligando-se especificamente às células-alvo por receptores de manose, ocorrendo a indução da produção das proteases e a fagocitose, levando a morte celular, sobretudo por apoptose, caracterizando a adesão, portanto, por ser um mecanismo fundamental para o estabelecimento da doença (ALIZADEH et al., 1994; CAO et al., 1998; KHAN, 2001; ALSAM et al., 2003; GONZÁLES-ROBLES et al.; 2006). Devido a esses fatores, o teste de efeito citopático parece ser o modelo experimental que mais se aproxima para demonstração do mecanismo de patogênese da *Acanthamoeba*.

Os resultados aqui apresentados identificaram que, das três linhagens utilizadas, a linhagem MDCK é a menos susceptível ao efeito citopático, o que sugere uma menor dependência de contato do mecanismo patogênico da ameba sobre esse tipo de linhagem, sendo os fatores independentes de contato mais importantes, considerando-se o resultado do efeito citotóxico, em que ela foi a mais susceptível. A linhagem MDCK é de origem epitelial e possui em sua monocamada junções celulares típicas desse tecido, sendo uma delas as *tight junctions* que se caracterizam por formar um contato mais próximo entre as células epiteliais adjacentes, criando uma barreira regulada à difusão de solutos no espaço paracelular (CHÁVEZ-MUNGUÍA et al., 2016), sendo que umas das primeiras alterações induzidas pelo efeito citopático em uma monocamada é a interrupção dessas junções.

A linhagem celular que apresentou melhor estabilidade, considerando as semelhanças em seus resultados nos testes de efeito citotóxico e efeito citopático e resposta ao aumento da virulência da *Acanthamoeba* pela passagem, foi a linhagem VERO. No modelo apresentado por Cursons e Browns (1978), foi descrito que a linhagem celular VERO permitia uma clara diferenciação entre espécies patogênicas e não patogênicas. Entretanto, os nossos resultados mostram que essa afirmativa depende de alguns fatores. Isolados que não tiveram efeito citopático sobre VERO, foram patogênicos para CHO e, em outro momento, ao aumentar a dose de trofozoítos, ou utilizar-se de trofozoítos que sofreram reativação ou aumento da

virulência pela passagem em linhagem celular, VERO passou a identificar isolados patogênicos por meio do efeito citopático. Ainda, segundo Cursons & Brown (1978), a escolha da linhagem celular apresentada não parece ser importante, porém, este estudo mostrou exatamente o contrário.

De todos os isolados, os que apresentaram maior ocorrência de grau 3 de efeito citopático foram A3P4 (T5-ambiental), Krt12.ROS (T4-clínico) e Krt16.PEN (T5-clínico). O genótipo mais agressivo foi o genótipo T5, seguido dos genótipos T4 e T3. Esse resultado condiz com os estudos que demonstraram que o genótipo T5 possui uma alta virulência e alto grau de patogenicidade (WALOCHNICK et al., 2000), sendo a espécie *A. lenticulata* a mais representativa e envolvida em casos de ceratite e encefalite (CABELLO-VILCHEZ, 2015).

O genótipo T4, mais encontrado na natureza, seguido de T5, é o responsável por cerca de 90% dos casos de ceratite, sendo também a maioria das infecções humanas associadas ao mesmo (BOOTON et al., 2005; MAGHSOOD et al., 2005; LEDEE et al., 2009). Já o genótipo T3, relacionado às espécies *A. griffini* e *A. pearcei*, causa ceratite e é menos encontrado do que os outros dois (LEDEE et al., 2009), sendo considerado não patogênico por Edagawa e colaboradores (2009), explicando o menor potencial patogênico demonstrado nos testes deste estudo.

Isolados de genótipo T5 geralmente utilizados em estudo são provenientes de amostras ambientais, sendo raro o isolamento clínico em pacientes com ceratite por *Acanthamoeba* (SPANAKOS et al., 2006) e a acantamebíase disseminada (BARETE et al., 2007), dessa forma, são de grande importância os dados aqui apresentados do par ambiental e clínico de T5, A3P4 e Krt16.PEN. Curiosamente, o segundo genótipo mais abundante em amostras ambientais, o T5, é subrepresentado nos casos de ceratite amebiana, sendo raros os casos relacionados a ele, entretanto, ele é considerado altamente virulento. É improvável que uma falta de exposição explique a baixa taxa de infecção pelo genótipo T5 (BOOTON et al., 2004; LEDEE et al., 2009), como descrito por De Jonckheere & Michel em 1988, onde identificaram a espécie *A. lenticulata*, com genótipo T5, presente na mucosa nasal de indivíduos saudáveis sem que eles apresentassem qualquer tipo de infecção. Entretanto, quando os isolados foram inoculados em ratos, foi demonstrada uma alta virulência.

Ainda, modelos de cultura de tecidos de animais mostraram que isolados T5 são capazes de ter um alto grau de patogenicidade (WALOCHNICK et al., 2000), corroborando os dados aqui apresentados.

Outro dado interessante sobre o efeito citopático é que o isolado que se mostrou mais virulento foi o de origem ambiental (A3P4, genótipo T5). Esperava-se que um isolado clínico apresentasse maior potencial patogênico, com alto efeito citopático, por já ser conhecidamente patogênico (ROCHA-AZEVEDO & SILVA FILHO, 2007; KHAN et al., 2000).

Atualmente, há pouca informação sobre diferenças nos mecanismos biológicos e citopatogênicos entre os isolados de *Acanthamoeba* e se elas se relacionam ou não com virulência de cada estirpe (OMANÑA-MOLINA et al., 2013). Estudos sobre a patogênese da ceratite amebiana revelaram que tanto isolados patogênicos quanto isolados não patogênicos de *Acanthamoeba* foram capazes de provocar lise da monocamada de células epiteliais de córnea *in vitro* (VAN KLINK et al., 1993). Omaniña-molina e colaboradores (2013) demonstraram que espécies de mesmo genótipo T4, teoricamente com mesmo potencial patogênico, apresentaram diferenças significativas em seus resultados, com *A. castellanii* apresentando crescimento mais lento do que *A. polyphaga*, entretanto, *A. castellanii* em testes MDCK e com invasão em órgãos de ratos demonstrou ser mais virulenta e invasiva do que *A. polyphaga*.

Pidherney e colaboradores (1993) ao realizarem estudos da atividade tumoricida de *A. castellanii*, observaram que existe uma relação importante entre a proporção de células tumorais e quantidade trofozoítos utilizados, sendo que ao duplicarem o número de trofozoítos inoculados não ocorreu crescimento tumoral. Logo, isso sugere que existe a quantidade de trofozoítos que é capaz de causar um maior ou menor dano celular. Nos testes de efeito citopático, uma variedade de doses, ou tamanhos do inóculos, é utilizada para análise de destruição celular em monocamadas de linhagens celulares. O dano celular provocado por trofozoítos de *Acanthamoeba* é diretamente relacionado à quantidade de ameba incubada e ao tempo de incubação com monocamada de linhagem celular, sendo que na medida em que mais amebas são inoculadas, mais rapidamente o efeito citopático é

produzido (VISVESVARA & BALAMUTH, 1975; JOHN & JOHN 1989). Dados relatados por Larkin e colaboradores (1991) indicam que existe uma concentração limiar de *Acanthamoeba* necessária para a indução do efeito citopático em culturas de células corneanas, portanto a relação ameba:célula afeta diretamente o EC. Nesta pesquisa, nem todo aumento de dose de trofozoítos foi capaz de provocar aumento na lesão, sugerindo especificidade de virulência ao isolado ou que são necessárias doses maiores das que as utilizadas aqui para que se obtivesse dano celular e também a resistência inerente à linhagem utilizada.

Além disso, uma relação padronizada dificulta a sua utilização universalmente, uma vez que se trata de células de mamíferos de tamanhos diferentes. Assim, a relação ameba:célula ganha melhor entendimento ao efeito citopático na medida em que a quantidade de espaço intercelular das linhagens celulares pode ser mais importante do que a quantidade de células em monocamada. Isso poderia explicar as diferenças de susceptibilidade apresentadas pelas linhagens utilizadas neste estudo, podendo ser resultado da facilidade com que a ameba tem acesso às bordas das células aderentes (NISZL et al., 1998). Células epiteliais estão mais intimamente ligadas do que células fibroblásticas, o que poderia explicar a maior resistência da MDCK ao teste de efeito citopático comparada a VERO e CHO. Aliado a isso, a resistência do tecido epitelial também fica evidente ao ser estabelecido que o microtrauma para o epitélio da córnea ser assumidamente um fator importante para facilitar a invasão da ameba e tem sido demonstrado *in vitro* que a lesão aumenta a exposição de glicoproteínas de manose, que promovem a adesão da *Acanthamoeba* a célula-alvo e, conseqüentemente, o início da patogênese.

Estudos realizados por Kinnear (2004) utilizando células epiteliais da córnea humana e queratócitos, sendo estes conhecidos como fibroblastos (WEST-MAYS & DWIVEDI, 2006), demonstraram que as células epiteliais eram manifestadamente mais resistentes que os queratócitos ao efeito citopático produzido por *A. castellanii*, sendo necessária dose maior para produzir danos visíveis. Os dados encontrados entre as linhagens celulares utilizadas neste trabalho corroboram os estudos de Kinnear (2004), sugerindo, também, que possivelmente a linhagem MDCK sofreria maior destruição aumentando-se a dose do inóculo de trofozoítos.

A diferença na susceptibilidade dos tipos de células aqui estudadas ao efeito citopático pode estar relacionada às diferentes morfologias que as linhagens apresentam (MDCK, epitelial; VERO e CHO, fibroblasto). Células do tipo fibroblasto não formam uma monocamada celular verdadeira, diferentemente das células epiteliais que, pelo contrário, formam uma monocamada com células individuais conectadas por junções apertadas (ou *tight junctions*) e desmossomos, sendo, portanto, mais firmemente unidas e mais resistentes (KINNEAR, 2004).

Em contrapartida, a destruição celular das linhagens pelos testes de efeito citotóxico e citopático pode variar de acordo com o nível de virulência dos isolados de *Acanthamoeba*. Um problema enfrentado nos experimentos com cultivos é a quantidade de repiques sucessivos que podem levar a uma perda da virulência desses isolados, sendo um fator importante de ser avaliado. O cultivo in vitro a longo prazo é conhecido por diminuir a virulência de vários parasitos protozoários, que podem ter essa virulência reativada por meio da produção de lesões experimentais em modelos animais, com posterior isolamento dos protozoários ou por meio do contato com monocamada de linhagem celular (CHÁVEZ-MUNGUÍA et al., 2016). Foi demonstrado que isso também ocorre em cultivo de *Acanthamoeba* e que é possível realizar a reativação dessa virulência, por meio da passagem dos trofozoítos em monocamada de linhagem de cultura de mamífero, expondo-os às células-alvos, e também pela técnica de inoculação desses protozoários em cobaias (MAZUR & HADAS, 1994; SCHUSTER, 2002; CHÁVEZ-MUNGUÍA et al, 2016).

Utilizamos a técnica de passagem em cultura de célula de mamífero para estudar a possível diferença de virulência dos isolados. Os resultados obtidos demonstraram que ocorreram mudanças no comportamento citotóxico dos isolados ao realizar a passagem dos mesmos em linhagem celular de mamífero do tipo MDCK ($p \leq 0,05$), conforme a média apresentada de -27,28% de destruição celular antes passagem e 2,44% de destruição celular após a passagem, ou seja, não houve, de uma maneira geral, destruição celular antes da passagem, o valor negativo indica que a monocamada cresceu, tendo em vista estar em meio de cultura próprio para tal fim e, após a passagem, houve destruição celular pelos meios condicionados coletados dos isolados de trofozoítos de *Acanthamoeba*. Também houve alteração no efeito citopático. Portanto, ocorreu um aumento da virulência dos isolados nos efeitos

citopático e citotóxico após a passagem de trofozoítos em cultura de linhagem celular MDCK. Isso demonstra semelhança ao aumento de virulência dos testes de Chávez-munguía e colaboradores (2016) que igualmente utilizaram a linhagem celular MDCK para incubar suas amostras de *Acanthamoeba* e obtiveram um aumento da indução da liberação dos grânulos eletro-densos relacionados à atividade proteolítica da ameba em relação às amebas que estavam sendo cultivadas a longo prazo, sendo esta atividade um marcador de virulência.

Diferentemente destes resultados, tem sido proposto que a expressão de patogenicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo* sejam características estáveis, relacionadas diretamente à fisiologia do isolado de *Acanthamoeba* e não devido a uma dependência de fatores externos, como as condições ambientais e os fatores do hospedeiro (WALOCHNIK et al., 2000; JEONG et al., 2007). Entretanto, os resultados aqui apresentados colaboram com o proposto por Omaña-molina e colaboradores (2013), os quais discutiram que a patogenicidade da ameba talvez seja uma característica intrínseca e a infecção por *Acanthamoeba* poderia resultar da correlação entre as características da ameba, como temperatura de crescimento, atividade proteolítica e o efeito mecânico durante o processo de invasão, bem como as condições do hospedeiro.

Assim, observa-se que dependendo da metodologia utilizada para a verificação da virulência de isolados de *Acanthamoeba*, a linhagem celular pode comportar-se de maneira diferente, como os resultados distintos de efeito citotóxico e citopático demonstraram. Dessa forma, um isolado não pode ser considerado não patogênico utilizando-se somente de uma metodologia, tendo em vista o caso de VERO no efeito citotóxico que antes do aumento da virulência dos trofozoítos foi resistente à ação do meio condicionado e após a reativação da virulência foi sensível.

Por outro lado, diante dos dados apresentados, algumas considerações devem ser feitas, como a quantidade de trofozoítos utilizada e o tempo de incubação com a linhagem. A quantidade de trofozoítos de *Acanthamoeba* pode ser aumentada para identificar isolados com potencial citopatogênico sobre linhagens celulares. O tempo de incubação utilizado foi de 24h. Entretanto, é possível que ao aumentar esse tempo, algumas amostras demonstrassem a ocorrência de efeito citopático de grau

4, com completa destruição da monocamada celular, podendo, até mesmo, medir o tempo necessário para alcançar esse nível de destruição, identificando diferentes virulências entre os isolados.

A avaliação do efeito citopático, nessa metodologia, tem um resultado semiquantitativo. Ainda é necessário melhorar a forma de avaliação, tornando-a menos subjetiva possível. Além disso, a não padronização desse teste, uma vez que são realizadas pesquisas com diversas metodologias, faz com que persistam incertezas quanto aos fatores que podem interferir nos resultados.

7 CONCLUSÃO

- Foi possível verificar diferença entre as virulências dos seis isolados de *Acanthamoeba*, entre os genótipos T3, T4 e T5 e entre amostras de origens clínicas e ambientais por meio do teste de efeito citopático, mas não no teste de efeito citotóxico;
- O isolado considerado mais virulento no efeito citopático foi o A3P4, de genótipo T5 e origem ambiental;
- O genótipo considerado mais virulento no efeito citopático foi o T5, seguido de T4 e T3;
- Os isolados clínicos tiveram maior virulência do que os isolados ambientais nos testes de efeito citopático;
- A passagem de trofozoítos de *Acanthamoeba* em linhagem celular do tipo MDCK demonstrou ser eficaz para aumentar a virulência da ameba, tanto em isolados ambientais, que teoricamente não tiveram contato prévio com algum hospedeiro, quanto em isolados clínicos, já conhecidamente patogênicos, conforme literatura, em ambos os testes. Tendo em vista esses aspectos observados, a interação da ameba com a linhagem celular, portanto, provoca ativação dos fatores de virulência desse protozoário.
- O teste de efeito citotóxico sofreu influência somente do tipo de linhagem utilizada, não sendo possível determinar diferença da virulência entre os isolados e outras variáveis por meio dele, sendo a linhagem MDCK a mais susceptível nesse teste, seguida de VERO e CHO.
- O tipo de linhagem celular utilizada interferiu na avaliação da virulência das amebas por meio do teste de efeito citopático, em que a linhagem CHO foi a mais susceptível, seguida de VERO e MDCK.

8 REFERÊNCIAS

- ADL, S. M.; SIMPSON, A. G.; FARMER, M. A.; ANDERSEN, R. A.; ANDERSON, O. R.; BARTA, J. R.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R. A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T. Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C. E.; LEWIS, L. A.; LODGE, J.; LYNN, D. H.; MANN, D. G.; MCCOURT, R. M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, O.; MOZLEY-STANDRIDGE, S. E.; NERAD, T. A.; SHEARER, C. A.; SMIRNOV, A. V.; SPIEGEL, F. W.; TAYLOR, M. F. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 52, p. 399-451, 2005.
- ALFIERI, S. C.; CORREIA, C. E.; MOTEGI, S. A.; PRAL, E. M. Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **J. Parasitol.**, 86:220–227. 2000.
- ALIZADEH, H.; PIDHERNEY, M. S.; MCCULLEY, J. P.; NIEDERKORN, J. Y. Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumor cells by a pathogenic free-living amoeba. **Infect. Immun.**, 62:1298-1303. 1994.
- ALLEN, P. G.; DAWIDOWICZ, E. A. Phagocytosis in *Acanthamoeba*. A mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. **J. Cell. Physiol.** 145: 508-513. 1990.
- ALSAM, S.; JOEANG, S. R.; DUDLEY, R.; KHAN, N. A. Role human tear fluid in *Acanthamoeba* interactions with the human corneal epithelial cells. **Int. Med. Microbiol.**, 298(3-4):329-36. 2007.
- ALSAM, S.; KIM, K. S.; STINS, M.; RIVAS, A. O.; SISSONS, J.; KHAN, N. A. *Acanthamoeba* interactions with human brain microvascular endothelial cells. **Microb. Pathog.**, 35, 235-241. 2003.
- AVERY, S. V.; HARWOOD, J. L.; LLOYD, D. Quantification and characterization of phagocytosis in the Soil Amoeba *Acanthamoeba castellanii* by Flow Cytometry. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1124-1132. 1995.
- BADENOCH, P. R.; ADAMS, M. e COSTER, D. J. Corneal virulence, cytopathic effect on human keratocytes and genetic characterization of *Acanthamoeba*. **Int. J. for Parasitol.**, 25: 229-239. 1995.
- BARETE, S.; COMBES, A.; DE JONCKHEERE, J. F.; DATRY, A.; VARNOUS, S.; MARTINEZ, V.; PTACEK, S. G.; CAUMES, E.; CAPRON, F.; FRANCES, C.; GIBERT, C.; CHASIDOW, O. Fatal disseminated *Acanthamoeba lenticulata* infection in a heart transplant patient. **Em. Infect. Dis.** 13, 736–738. 2007.
- BLOCH, K. C.; SCHUSTER, F. L. Inability to make a pre mortem diagnosis of *Acanthamoeba* species infection in a patient with fatal Granulomatous amebic encephalitis. **J. Clin. Microbiol.**, 43(1):3003–3006. 2005.
- BOOTON, G. C.; ROGERSON, A.; BONILLA, T. D.; SEAL, D. V.; KELLY, D. J.;

- BEATTIE, T. K.; TOMLINSON, A. ; LARES-VILLA, F. ; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp., causal agent of *Acanthamoeba* keratitis. **J. Eukaryot. Microbiol.** 51:192-200. 2004
- BOOTON, G. C.; VISVESVARA, G. S.; BYERS, T. J.; KELLY, D. J.; FUERST, P. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with non keratitis infections. **J. Clin. Microbiol.**43(4):1689-93. 2005.
- BOWERS, B. & OLSZEWSKI, T. E. *Acanthamoeba* discriminates internally between digestible and indigestible particles. **JCB.** 97: 317-322. 1983.
- BOWERS, B.; KORN, E. D. Cytochemical Identification of phosphatase activity in the contractile vacuole of *Acanthamoeba*. **J. Cell Biol**, 59(03):784-791. 1973.
- BYERS, T. J. Growth, reproduction, and differentiation in *Acanthamoeba*. **Int. Rev. Cytol**, 61:283–338. 1979.
- CABELLO-VÍLCHEZ, A. M. *Acanthamoeba* spp. um agente oportunista em infecciones humanas. **Rev. de Invest. Univ. Norbert Wiener**, n 4. 2015.
- CAO, Z.; JEFFERSON, M. D.; PANJWANI, N. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. **J. Biol. Chem.** 273, 15838–15845. 1998.
- CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; SALAZAR-VILLATORO, L.; OMAÑA-MOLINA, M.; ESPINOSA-CANTELLANO, M.; RAMÍREZ-FLORES, E.; LORENZO-MORALES, J.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Acanthamoeba culbertsoni*: Electron-dense ranules in a highlyvirulentclinicalisolate. **J. Eukaryot. Microbiol.**,63(6):744-750. 2016.
- CHO, J. H., B. K. NA, T. S. KIM; C. Y. SONG. Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. **IUBMB Life**,50:209–214. 2000.
- CORDINGLEY, J. S.; WILLS, R. A.; VILLEMEZ, C. L. Osmolarity is an independent trigger of *Acanthamoeba castellanii* differentiation. **J. Cell. Biochem.**,61:167–71. 1996.
- CORSARO, D.; VENTDITTI, D. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). **Parasitol. Res.**, 107:233–238. 2010.
- CORSARO, D.; WALOCHNIK, J.; KÖHSLER, M. e ROTT, M. B. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). **Parasitol. Res.**, 114(7):2481-2490. 2015.
- CULBERTSON, C. G.; SMITH, J. W.; COHEN, H. K.; MILLER, J. R. 1959. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. **Am. J. of Pathol.**, 35:185-197. 1959.

- CURSONS, R. T. M.; BROWN, T. J.; KEYS, E. A. Virulence of Pathogenic free-living amoebae. **The J. of Parasitol.**,64(4):744-745. 1978
- DA ROCHA-AZEVEDO, B., COSTA E SILVA-FILHO, F. Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga*: analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. **Arch. Microbiol.** 188:441–449. 2007.
- DA ROCHA-AZEVEDO, B.D.; JAMERSON, M.; CABRAL, G. A.; SILVA-FILHO, F. C.; MARCIANO-CABRAL, F. *Acanthamoeba* interaction with extracellular matrix glycoproteins: biological and biochemical characterization and role in cytotoxicity and invasiveness. **J. Eukaryot. Microbiol.**, 56: 270278. 2009.
- DE JONCKHEERE, J. F.; R, MICHEL. Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. **Parasitol.**, 74:314-316. 1988.
- DE JONCKHEERE, J. F. Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing and taxonomy of the genus *Acanthamoeba* spp. **Parasitol. Res.** 83: 345 – 348. 1983.
- DE JONCKHEERE, J. F. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture; and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. **Appl. Environ. Microbiol.**, 39:681-685. 1980.
- DE JONCKHEERE, J.F. Ecology of *Acanthamoeba*. **Ver. Infect. Dis.**,13:S385-S387. 1991.
- DEARBORN, D. G. & KORN, E. D. Lipophosphoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. **J. Biol. Chem.** 249: 3342-3346. 1974.
- EDAGAWA, A.; KIMURA, A.; KAWABUCHI-KURATA, T.; KUSUHARA, Y.; KARANIS, P. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. **Parasitol. Res.** 105, 1109–1117. 2009.
- FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 5 ed. **John Wiley & Sons**, 2005.
- FUERST, P. A.; BOOTON, G. C.; CRARY, M. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. **J. of Eukaryot. Microbiol.**, 62(1)69-84. 2015.
- GARATE, M.; CAO, Z.; BATEMAN, E.; PANJWANI, N. Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. **J Biol. Chemist.**, 279:29849-29856. 2004.
- GARATE, M.; MARCHANT, J.; CUBILLOS, I.; CAO, Z.; KHAN, N. A.; PANJWANI, N. In vitro pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 47: 1056–1062. 2006b.

- GAST, R. J. Development of an *Acanthamoeba*- specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. **J. Eukaryot. Microbiol.**, 48:609-615. 2001.
- GAST, R. J. Systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. **J. Euk. Microbiol.**, 43(6): 498–504. 1996.
- GONZALEZ-ROBLES, A.; CASTANON, G.; CRISTOBAL-RAMOS, A. R.; LAZARO-HALLER, A.; OMANA-MOLINA, M.; BONILHA, P.; MARTINEZ-PALOMO, A. 2006. *Acanthamoeba castellanii*: structural basis of the cytopathic mechanism. **Exp. Parasit.**, 114:133-140. 2006.
- GONZÁLEZ-ROBLES, A.; SALAZAR-VILLATORO, L.; OMAÑA-MOLINA, M.; MARTÍN-NAVARRO, C. M.; LORENZO-MORALES, J. Morphological Features and In vitro cytopathic effect of *Acanthamoeba griffin* trophozoites isolated from a Clinical Case. **J. Parasitol. Res.**, 014:256310. 2014.
- GONZÁLEZ-ROBLES, A.; SALAZAR-VILLATORO, L., OMAÑA-MOLINA, M., LORENZO-MORALES, J., & MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Acanthamoeba royreba*: Morphological features and in vitro cytopathic effect. **Exp. Parasitol.**, 133(4):369–375. 2013.
- GRIFFIN, J. L. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. **Science**. 24; 178(63):869-70. 1972.
- HE, Y. G., NIEDERKORN, J. Y., MCCULLEY, J. P., STEWART, G. L., MEYER, D.; SILVANY, R.; DOUGHERTY, J. In vivo and in vitro collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 31(11)2235-40. 1990.
- HEWETT, M. K.; ROBINSON, B. S.; MONIS, P. T.; SAINT, C. P. Identification of a New *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). **Acta Protozool.**, 42:325–329. 2003.
- HONG, Y. C.; KONG, H. H.; OCK, M. S.; KIM, I. S. e CHUNG, D. I. Isolation and characterization of a cDNA encoding a subtilisin-like serine proteinase (ahSUB) from *Acanthamoeba bahealyi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 111: 441-446. 2000.
- HORN, M., FRITSCH, T.R., GAUTOM, R.K., SCHLEIFER, K.H., WAGNER, M. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. Related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. **Environ. Microbiol.**, 1:357–367. 1999.
- JEONG, S. R.; LEE, S. C.; SONG, K. J.; PARK, S.; KIM, K.; KWON, M. H.; IM, K. I.; SHIN, H. J. Expression of the *nfa1* gene cloned from pathogenic *Naegleria fowleri* in nonpathogenic *N. gruberi* enhances cytotoxicity against CHO target cells in vitro. **Infect. Immun.**, 73:4098-4105. 2005.
- JEONG, H.J.; LEE, S.J.; KIM, J.H.; XUAN, Y.H.; LEE, K.H.; PARK, S.K.; CHOI, S.H.; CHUNG, D.I.; KONG, H.H.; OCK, M.S.; YU, H.S. *Acanthamoeba*: keratopathogenicity of isolates from domestic tap water in Korea. **Experim. Parasitol.** 117:357-367. 2007.

JOHN, D. T. & JOHN, R. A. Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* in mammalian cell cultures. **Parasitol. Res.**, 76: 2025. 1989.

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

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

KHAN, N. A. Pathogenicity, morphology and differentiation of *Acanthamoeba*. **Curr. Microbiol.**, 43:391–5. 2001.

KHAN, N. A.; E.L. JARROLL.; T. A. PAGET. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Curr. Microbiol.**43:204-208. 2001.

KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. **Curr. Microbiol.**, 45:197–202. 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.**, 38:2858-61. 2000.

KIM, W. T.; KONG, H. H.; HA, Y. R.; HONG, Y. C.; JEONG, H. J.; YU, H. S e 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.**, 44:321-330. 2006.

KINNEAR, F. B. *Acanthamoeba* pathogenicity for corneal cells. **J. Infect.**, 49:310-316. 2004.

KÖHSLER, M.; LEITSCH, D.; DUCHÊNE, M.; NAGL, M.; WALOCHNIK, J. *Acanthamoeba castellanii*: growth on human cell layers reactivates attenuated properties after prolonged axenic culture. **FEMS Microbiol. Let.**, 299: 121127. 2009.

KRÓL-TURMINSKA, K.; OLENDER, A. Human infections caused by free-living amoebae. **Ann Agric Environ Med**, 24(2):254-260. 2017.

KUPCSIK, L. Estimation of Cell Number Based on Metabolic Activity: The MTT education Assay. In: STODDART, M.J. Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols. **Nova York: Humana Press**, cap.3, 2011.

LARKIN, D. F.; BERRY, M.; EASTY, D. L. In vitro corneal pathogenicity of *Acanthamoeba*. **Eye**, 5:560-568. 1991.

LEDEE, D. R.; IOVIENO, A.; MILLER, D.; MANDAL, N.; DIAZ, M.; FELL, J.; FINI, M. E.; ALFONSO, E. C. Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. **J. Clin. Microbiol.** 47, 1458–1462. 2009.

- LEHER, H.; SILVANY, R.; ALIZADEH, H.; HUANG, J. e NIEDERKORN, J. Y. Mannose induces the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. **Infe. And Imm.**, 66:5-10. 1998a.
- LEHER, H.; ZARAGOZA, F.; TAHERZADEH, S.; ALIZADEH, H.; NIEDERKORN, J. Y. Manno induces the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. **Infect. Immun.**, 66: 5-10.1998.
- LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, 22:10. 2015.
- MAGNET, A.; HENRIQUES-GIL, N.; GALVÁN-DIAZ, A. L.; IZQUIEDO, F.; FENOY, S.; DEL AGUILA, C. Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. **Parasitol. Res.**, 113(8):2845– 2850. 2014.
- MAGSHOOD, A. H.; SISSONS, J.; REZAIAN, M.; NOLDER, D.; WARHURST, D.; KHAN, N. A. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, p. 755–759, 2005.
- MARCIANO-CABRAL, F. e CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. **Clin. Microbiol. Rev.**, 16 (2): 273-307, 2003.
- MARCIANO-CABRAL, F.; PATTERSON, M.; JOHN, D. T.; BRADLEY, S. G. Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* for established mammalian cell cultures. **J. Parasitol.**, 68: 1110–1116. 1982.
- MARTINEZ, A. J. Free-living Amebas: Natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease. Boca Raton, FL, **CRC Press**. 1985.
- MARTINEZ, A. J. Infections of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. **Rev. Infect. Dis**, 13:S399–S402. 1991.
- MARTINEZ, A. J.; JANITSCHKE, K. *Acanthamoeba*, an opportunistic Microorganism. Review. **Infection.**, 13: 251-56. 1985.
- MATTANA, A.; BENNARDINI, F.; USAI, S.; FIORI, P. L.; FRANCONI, F.; CAPPUCOINELLI, P. *Acanthamoebacastellanii* metabolites increase the intracellular calcium level and cause cytotoxicity in Wish cells. **Microb. Pathog.**, 23(2):85-93. 1997.
- MAZUR, T.; HADAS, E. The effect of the passages of *Acanthamoeba* strains through mice tissues on their virulence and its biochemical markers. **Parasitol Res.** 1994;80:431–434. 1994.
- MAZUR, T.; HADAS, E.; IWANICKA, I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. **Trop. Med. Parasitol.** 46: 106–108. 1995.

MCKERROW, J. H.; SUN, E.; ROSENTHAL, P.J., BOUVIER J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. **Annu. Rev. Microbiol.** 47: 821-853. PMID: 8257117. 1993.

MORTON, L. D.; MCLAUGHLIN, G. L.; WHITELEY, H. E. Effect of temperature, amebic strain and carbohydrates on *Acanthamoeba* adherence to corneal epithelium in vitro. **Infect Immun**, 59:3819–22. 1991.

NIEDERKORN, J. Y.; UBELAKER, J. E.; MCCULLEY, J. P.; STEWART, G. L.; MEYER, D. R.; MELLON, J. A.; SILVANY, R. E.; HE, Y. G.; PIDHERNEY, M.; MARTIN, J. H. Susceptibility of corneas from various animal species to in vitro binding and invasion by *Acanthamoeba castellanii*. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 33(1):104-12. 1992.

NISZL, I.A.; VEALE, R.B.; MARKUS, M.B. Cytopathogenicity of clinical and environmental *Acanthamoeba* isolates for two mammalian cell lines. **J. Parasitol.**, 84:961-967. 1998.

NUPRASERT, W.; PUTAPORNTIP, C.; PARIYAKANOK, L. e JONGWUTIWES. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 4636–4640. 2010.

OMAÑA-MOLINA, M.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; SALAZAR-VILLATORO, I. L.; CRISTÓBAL-RAMOS, A. R.; GONZÁLEZ-LÁZARO, M.; SALINAS-MORENO, E.; MÉNDEZ CRUZ, A. R.; SÁNCHEZ-CORNEJO, M.; TORRE GONZÁLES, E.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Acanthamoeba castellanii*: Morphological analysis of the interaction with cornea. **Experim. Parasitol.**, 126:73-78. 2010.

OMAÑA-MOLINA, M.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; SALAZAR-VILLATORO, I. L.; LORENZO-MORALES, J.; CRISTÓBAL-RAMOS, A. R.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, V. I.; TALAMÁS-ROHANA, P.; MÉNDEZ CRUZ, A. R.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. Reevaluating the role *Acanthamoeba* proteases in tissue invasion: observation of cytopathogenic mechanisms on MDCK cell monolayers and hamster corneal cells. **Biomed. Res. Int.**, 2013:461329. 2013.

ONG, T. Y. Y.; KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. Brain-eating Amoebae: predilections sites in the brain and disease outcome. **J. Clin. Microbiol.**, 55(7):1989-1997. 2017.

PAGE, F.C. 1988. A new key to Freshwater and soil Gymnamoebae. **Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK.** 122pp.

PANJWANI, N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. **Ocul Surf**, 8:70-9. 2010.

PIDHERNEY, M. S.; ALIZADEH, H.; STEWART, G. L.; MCCULLEY, J. P.; NIEDERKORN, J. Y. In vitro and in vivo tumoricidal properties of a pathogenic/free-living amoeba. **Cancer Letters**, 72:91–98. 1993.

- POSSAMAI, C. O.; LOSS, A. C.; COSTA, A. O.; FALQUETO, A.; FURST, C. *Acanthamoeba* of three morphological groups and distinct genotypes exhibit variable and weakly inter-related physiological properties. **Parasitol. Res.**, 2018.
- PRESTON, T. M. & KING, C. A. Binding sites for bacterial *Flagella* at the surface of the soil Amoeba *Acanthamoeba*. **J. Gen. Microbiol.** 130:1449-1458. 1984.
- PUMIDONMING, W.; KÖHSLER, M. e WALOCHNIK, J. *Acanthamoeba* strains show reduced temperature tolerance after long-term axenic culture. **Parasitology Research**, 106:553559. 2010.
- PUSSARD, M., & R. PONS. Morphologies de laparoikystique et taxonomie Du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistol.**, 13: 557-610. 1977.
- QVARNSTROM, Y.; NERAD, T. A. e VISVESVARA, G. S. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal Amoebic Encephalitis. **J. Eukaryot. Microbiol.**, 60:626–633. 2013.
- REN, M. & WU, X. Evaluation of three different methods to establish animal models of *Acanthamoeba* keratitis. **Y. Med. J.**, 51:121-127. 2010.
- REZAEIAN, M.; NIYYATI, M.; FARNIA, F.; MONTEVALLI HAGHI, A. Isolation of *Acanthamoeba* spp. from different environmental sources. **Iranian J. Parasitol.**, 3(1):44-7. 2008.
- ROCHA-AZEVEDO, B. D.; COSTA E SILVA-FILHO, F. Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga*: analysis of relevant parameters to decode pathogenecity. **Arch. Microbiol.** 188(5):441-9. 2007.
- ROWBOTHAM, T. J. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. **J. Clin. Pathol.** 33:1179-1183. 1980.
- SARAVANAN, C.; CAO, Z.; KUMAR, J.; QIU, J.; PLAUT, A. G.; NEWBURG, D. S.; PANJWANI, N. 2008. Milk components inhibit *Acanthamoeba*-induced cytopathic effect. **Inv. Ophthal. & Vis. Sci.**, 49:1010-1015. 2008.
- SCHUSTER, F. L. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. **Clin. Microbio. Rev.**, 15 (3):342-354. 2002.
- SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals, **Int. J. for Parasitol.**, 34(9):1001-1027. 2004.
- SERRANO-LUNA, J.; PINA-VÁZQUES, C.; REYES-LÓPEZ, M.; ORTIZ-ESTRADA, G.; DE LA GARZA, M. Proteases from *Entamoeba* spp. And pathogenic free-living amoeba as virulence factors. **J. Trop. Med**, 2013:890603. 2013.
- SHIN, H. J.; LA, M. S.; IM, K. I. Cytotoxicity of *Acanthamoeba* sp. YM-4 (Korean isolate). **Yonsei Rep Trop Med.**, 24:31–38. 1993.

- SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Is ritual cleansing a missing link between fatal infection and brain eating amoeba? **Clin. Infect. Dis**, 54(12):1817–1818. 2012.
- SISSONS, J.; ALSAM, S.; GOLDSWORTHY, G.; LIGHTFOOT, M.; JARROLL, E. L.; KHAN, N. A. Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis. **BMC Microbiol.**, 3:6-42. 2006.
- SPANAKOS, G.; TZANETOU, K.; MILTSAKAKIS, D.; PATSOULA, E.; MALAMOULADA, E.; VAKALIS, N. C. Genotyping of pathogenic *Acanthamoebae* isolated from clinical samples in Greece—report of a clinical isolate presenting T5 genotype. **Parasitol. Int.**, 55, 147–149. 2006.
- STEVENS, A. R.; O'DELL, W. D. In vitro growth and virulence of *Acanthamoeba*. **J Parasitol.**, 60(5):884-5. 1974.
- STOPAK, S. S.; ROAT, M. I.; NAUHEIM, R. C.; TURGEON, P. W.; SOSSI, G.; KOWALSKI, R. P.; THOFT, R. A. Growth of *Acanthamoeba* on human corneal epithelial cells and keratocytes in vitro. **Invest. Ophthalmol.**, Visual Sci. 32:354-359.1991.
- STOTHARD, D.R.; SCHROEDER-DIEDRICH, J. M.; AWWAD, M.H.; GAST, R.J.; LEDEE, D. R.; RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S.; DEAN, C. L.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **J. Euk. Microbiol.**, 45: 45–54. 1998.
- STRATFORD, M. P.; GRIFFITHS, A. J. Variations in the properties and morphology of cysts of *Acanthamoeba castellanii*. **J. Gen. Microbiol.**, 108:33-37. 1978.
- TAKAOKA-SUGIHARA, N.; YAMAGAMI, S.; YOKOO, S.; MATSUBARA, M.; YAGITA, K. Cytopathic effect of *Acanthamoeba* on human corneal fibroblasts. **Mol Vis.**, 18:2221-8. 2012.
- TAYLOR, W. M.; PIDHERNEY, M. S.; ALIZADEH, H.; NIEDERKORN, J. Y. In vitro characterization of *Acanthamoeba castellanii* cytopathic effect. **J. Parasitol.**, 81:603-609. 1995.
- TEIXEIRA, L. H.; ROCHA, S.; PINTO, R. M. F.; CASEIRO, M. M.; COSTA, S. O. P. P. Prevalence of potentially pathogenic free-living amoebae from *Acanthamoeba* and *Naegleria* genera in non-hospital, public, internal environments from the city of Santos, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, 13:395-397. 2009.
- TRABELSI, H.; DENDANA, F.; SELLAMI, A.; SELLAMI, .; CHEIKHROUHOU, F.; NEJI, S.; MAKNI, F.; AYADI, A. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. **Pathol. Biol**, 60(6):399-405. 2012.
- TURNER, N. A.; RUSSELL, A. D.; FURR, J. R.; LLOYD, D. Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. **J Antimicrob. Chemother.**, 46:27–34. 2000.

VAN KLINK, F.; ALIZADEH, H.; STEWART, G. L.; PIDHERNEY, M. S.; SILVANY, R. E.; HE, Y.; MCCULLEY, J. P.; NIEDERKON, J. Y. Characterization and pathogenic potential of a soil isolate and an ocular isolate of *Acanthamoeba castellanii* in relation to *Acanthamoeba* keratites. **Curr. Eye Res.**, 11:1207-1220. 1992.

VISVESVARA G. S; SHER-GREEN J. Epidemiology of free-living ameba infection. **J Protozool.**, 37:25S-33S. 1990.

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

VISVESVARA, G. S. Classification of *Acanthamoeba*. **Rev. Infect. Dis.**, 13 (S5):S369-S372. 1991.

VISVESVARA, G. S.; BALAMUTH, W. Comparative studies on related free-living and pathogenic amoebae, with special reference to *Acanthamoeba*. **J Protozool** 22: 245–256. 1975.

VISVESVARA, G. S.; SCHUSTER, F. L. Opportunistic Free-Living Amebae, Part II. **Clin. Microbiol. Newsletter.** 30(20):151-158. 2008.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **App. and Env. Microbiol.**, 66(10):4408-4413. 2000.

WEISMAN, R. A. Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. **Ann. Rev. Microbiol.**, 30:189–219. 1976.

WEST-WAYS, J. A. & DWIVEDI, D. J. The keratocyte: Corneal stromal cell with variable repair phenotypes. **Int. J. Biochem. and Cell Biol.**, 38:1625-1631. 2006.

YANG, Z. T.; CAO, Z. Y.; PANJWANI, N. Pathogenesis of *Acanthamoeba keratitis*: carbohydrate-mediated host parasite interactions. **Infect Immun**, 65:439–45. 1997.

YOO, K. T.; JUNG, S. Y. Effects of mannose on pathogenesis of *Acanthamoeba castellanii*. **Korean J. Parasitol.**, 50(4):365-9. 2012.

ANEXO 1a

Meios de Culturas e Soluções

Meio de cultura PYG

Reagentes	Quantidade para 1 L
Proteose Peptona	20 g
Extrato de Levedo	2,0 g
Sulfato de Magnésio – $MgSO_4 \cdot 2 H_2O$	0,98 g
Citrato de Sódio – $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2 H_2O$	1,0 g
Sulfato Ferroso Amoniacal – $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$	0,02 g
Fosfato de Sódio Bibásico – $Na_2HPO_4 \cdot 7 H_2O$	0,4 g
Fosfato de Potássio Monobásico – KH_2PO_4	0,34 g
Cloreto de Cálcio – $CaCl_2 \cdot 2 H_2O \cdot 2 H_2O$	0,06 g
Glicose	9,0 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

Preparo:

- 1) Dissolver todos os sais em 500 mL de água destilada;
- 2) Adicionar os outros reagentes;
- 3) Completar o volume com água destilada q.s.p 1000 mL;
- 4) Ajustar o pH para 6,2;
- 5) Autoclavar o meio de cultura a 121°C por 15-20 min,
- 6) Armazenar em geladeira a 4°C.

Salina de Page (PAGE, 1988)

Reagentes	Quantidade para 1 L
Cloreto de Sódio – NaCl	1,20 g
Sulfato de Magnésio – $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,04 g
Fosfato de Sódio Bibásico – Na_2HPO_4	1,42 g
Fosfato de Potássio Monobásico – KH_2PO_4	1,36 g
Cloreto de Cálcio – $CaCl_2 \cdot 2 H_2O \cdot 2 H_2O$	0,04 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

Preparo:

- 1) Preparar soluções estoque de cada reagente em 100 mL de água destilada;
- 2) Misturar 10 mL de cada solução estoque e completar com água destilada até 1000 mL;
- 3) Autoclavar a solução a 121°C por 15-20 min;
- 4) Distribuir aproximadamente 5 mL da salina em tubos esterilizados e armazenar em geladeira a 4°C.

ANEXO 1b

Meios de Culturas e Soluções

Meio de cultura DMEM

Reagentes	Quantidade para 1 L
Frasco DMEM, pó para dissolução	01 un
Antibiótico – Penicilina, Estrptomomicina e Anfotericina B	3,3 mL
Gentamicina	1,0 mL
Bicarbonato de sódio	3,7 g
Soro Bovino Fetal (10% de SBF)	100 mL
Água destilada autoclavada q.s.p	1000 mL

Preparo:

- 1) Dissolver todos os reagentes em 500 mL de água destilada;
- 2) Completar o volume com água destilada q.s.p 1000 mL;
- 3) Ajustar o pH para 7,3;
- 4) Filtrar em capela de fluxo laminar;
- 5) Distribuir em frascos cônicos de 50 mL;
- 6) Armazenar em freezer a -4°C.

Meio de cultura F-12

Reagentes	Quantidade para 1 L
F-12, sachê, pó para dissolução	01 un
Antibiótico – Penicilina, Estrptomomicina e Anfotericina B	3,3 mL
Gentamicina	1,0 mL
Soro Bovino Fetal (10% de SBF)	100 mL
Bicarbonato de sódio	3,7 g
Soro Bovino Fetal (10% de SBF)	100 mL
Água destilada autoclavada q.s.p	1000 mL

Preparo:

- 1) Dissolver todos os reagentes em 500 mL de água destilada;
- 2) Completar o volume com água destilada q.s.p 1000 mL;
- 3) Ajustar o pH para 7,3;
- 4) Filtrar em capela de fluxo laminar;
- 5) Distribuir em frascos cônicos de 50 mL;
- 6) Armazenar em freezer a -4°C.

Solução PBS

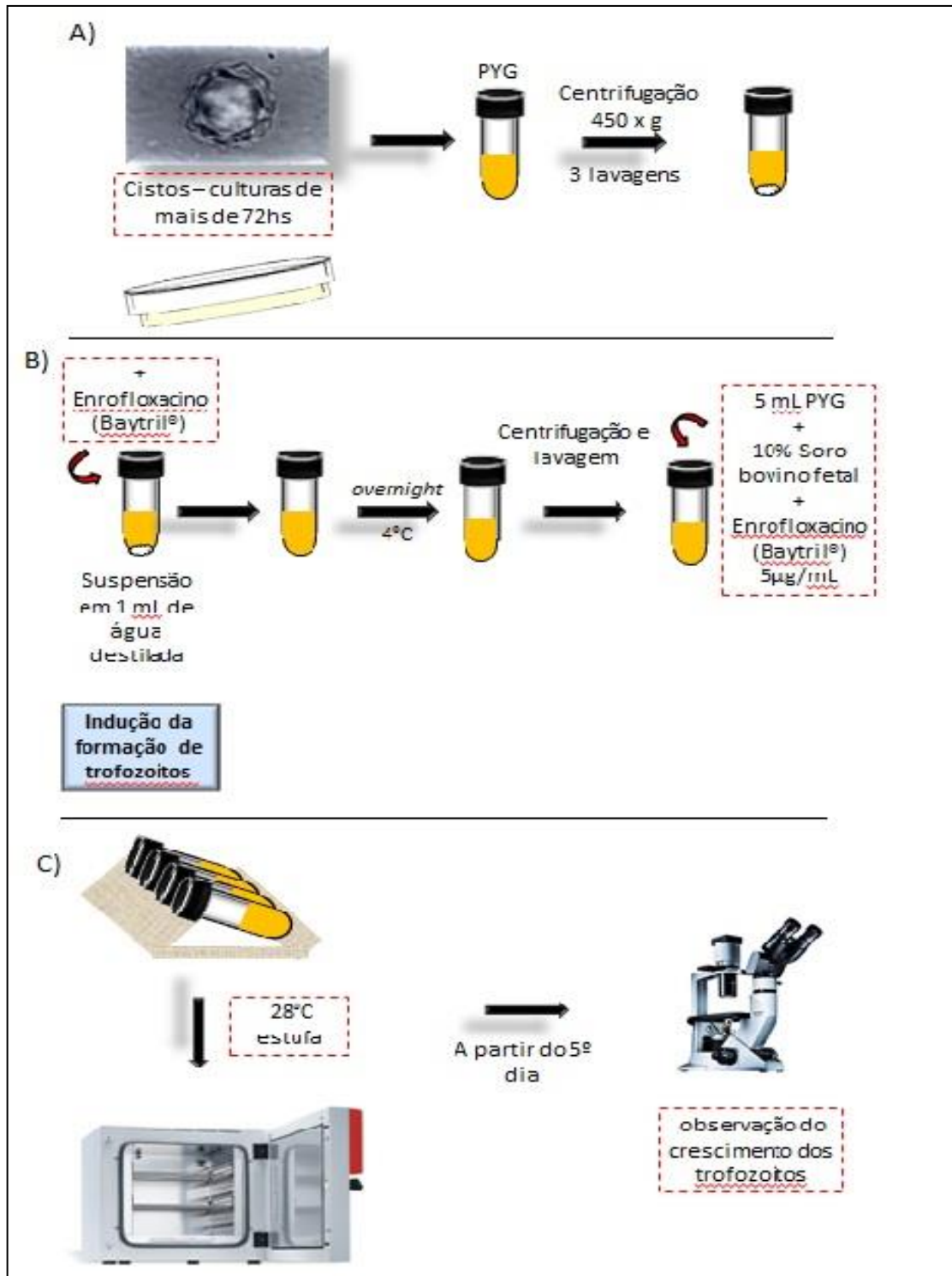
Reagentes	Quantidade para 1 L
Cloreto de Sódio – NaCl	8,04 g
Fosfato de Sódio Bibásico – Na ₂ HPO ₄	1,519 g
Fosfato de Potássio Monobásico – KH ₂ PO ₄	0,566 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

Preparo:

- 1) Dissolver todos os reagentes em 500 mL de água destilada;
- 2) Completar o volume com água destilada q.s.p 1000 mL;
- 3) Ajustar o pH para 7,2;
- 4) Autoclavar o meio de cultura a 121°C por 15-20 min,
- 5) Armazenar em geladeira a 4°C.

ANEXO 2

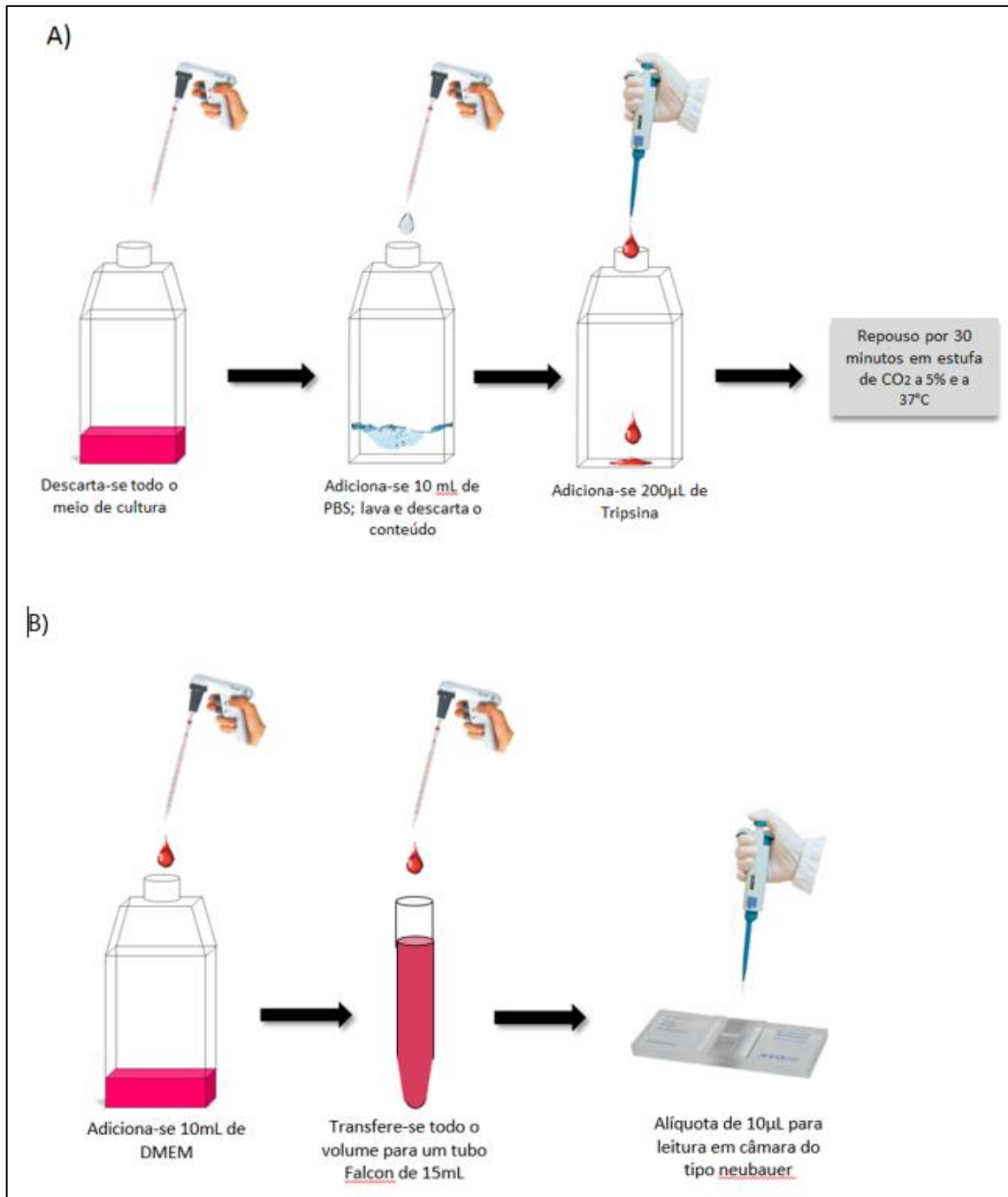
Esquemática do processo de axenização de amostras de *Acanthamoeba*



Fonte: elaborada pela autora. Adaptado de ROWBOTHAM, 1980.

ANEXO 3

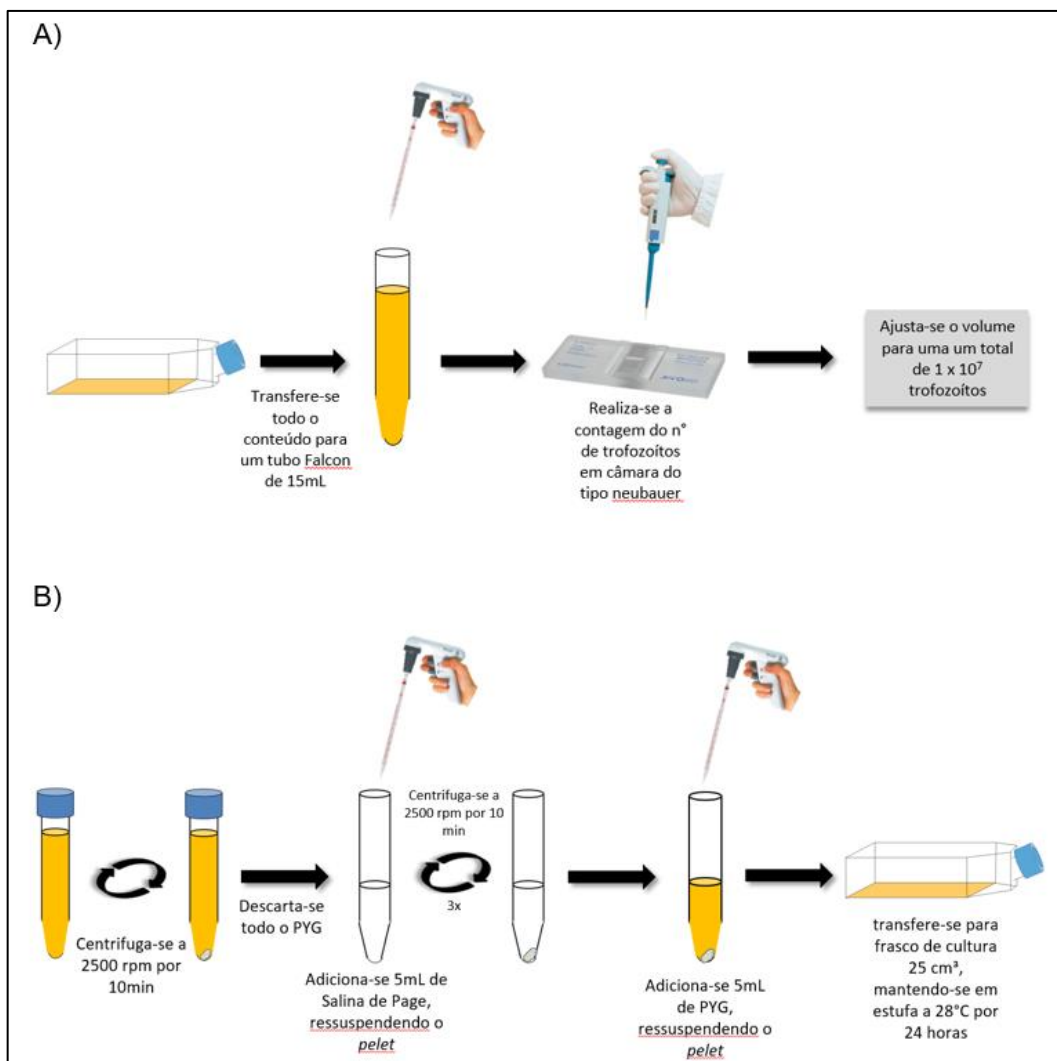
Tripsinição de linhagem celular para contagem de células



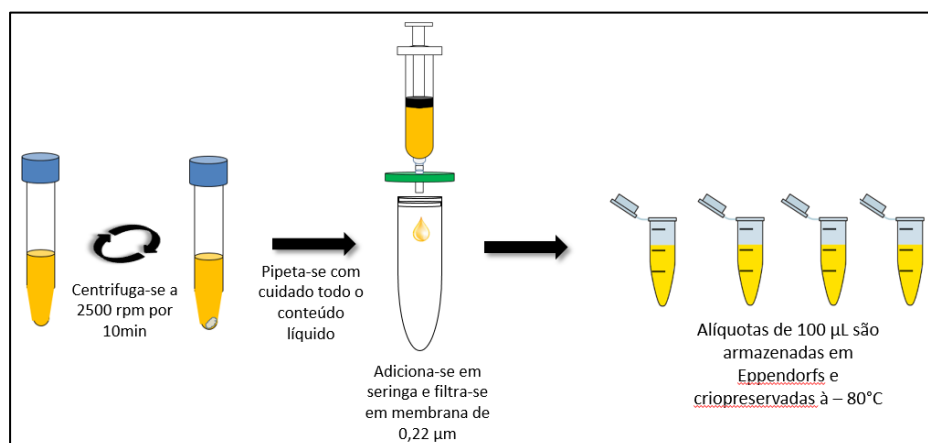
A) Tripsinação. B) Contagem celular. Fonte: elaborado pela autora.

ANEXO 4

Preparação da amostra para produção de meio condicionado



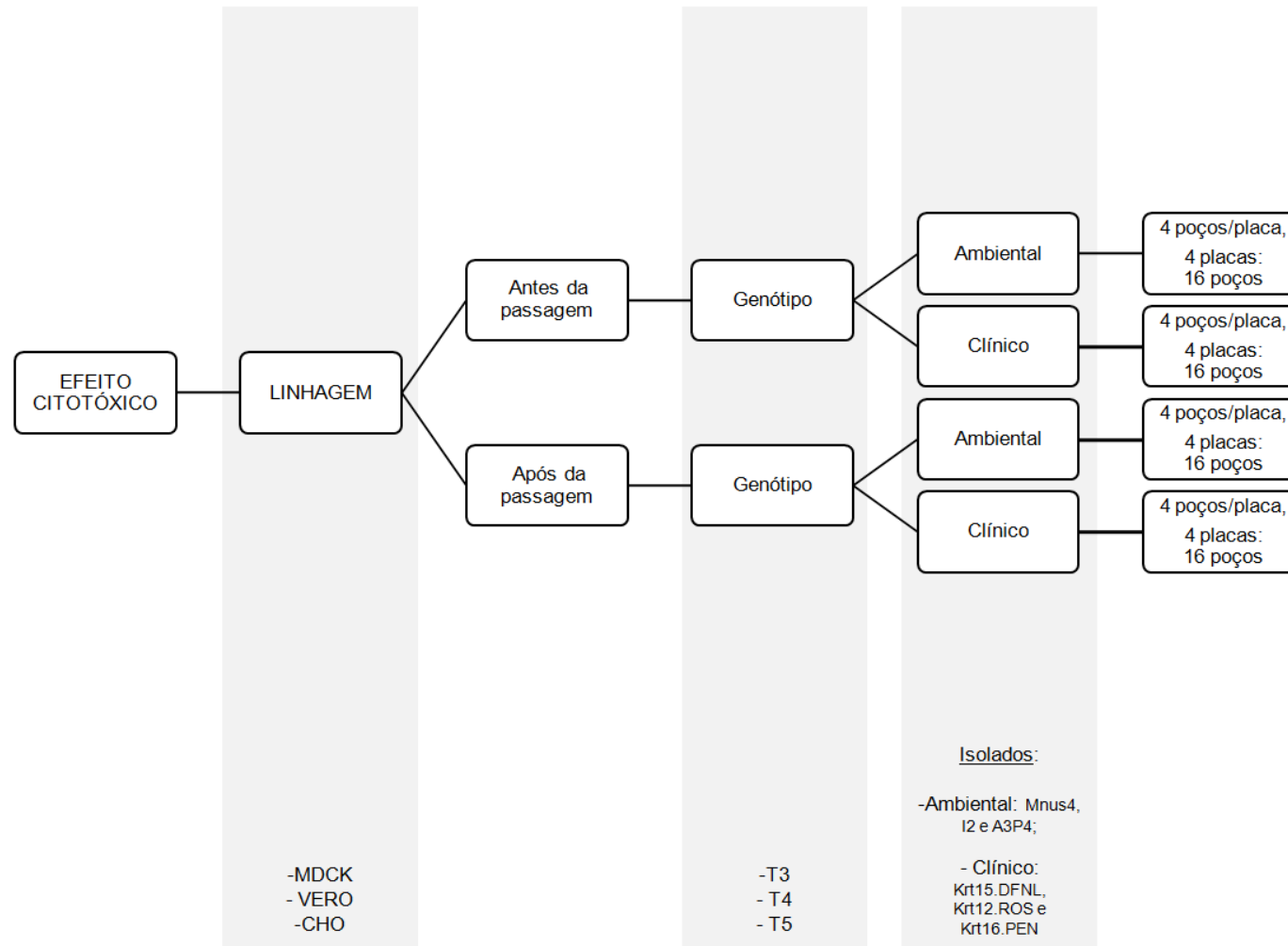
A) Contagem de trofozoitos de *Acanthamoeba* em câmara de Neubauer. B) Lavagem e armazenamento em frasco de cultura. Fonte: elaborado pela autora



Filtração do meio condicionado e seu acondicionamento. Fonte: elaborado pela autora

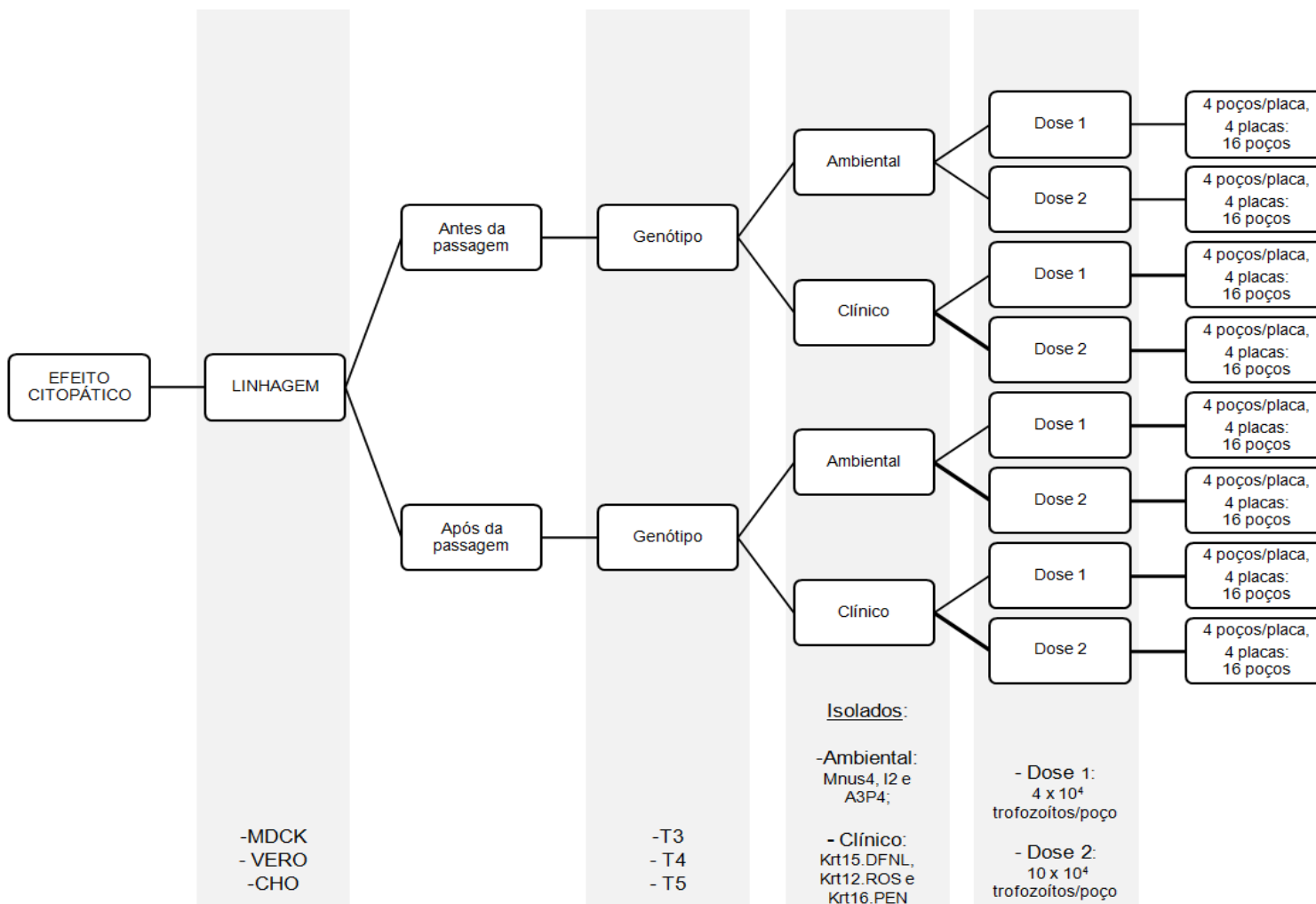
ANEXO 5

Fluxograma do teste de Efeito Citotóxico



ANEXO 6

Fluxograma do teste de Efeito Citopático



ANEXO 7a

Efeito Citotóxico – antes da passagem celular

Informações descritivas das variáveis antes da passagem celular

Variável / Categoria	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	
LINHAGEM	CHO	-199,00	116,00	-58,38	58,16
	MDCK	-27,00	35,00	7,75	18,85
	VERO	-123,00	34,00	-31,21	41,31
GENOTIPO	T3	-199,00	35,00	-42,54	58,19
	T4	-116,00	33,00	-26,21	39,86
	T5	-115,00	116,00	-13,08	48,18
ORIGEM	Ambiental	-134,00	116,00	-23,19	53,91
	Clinica	-199,00	32,00	-31,36	46,39
ISOLADO	A3P4	-115,00	116,00	-3,58	55,83
	DFNL	-199,00	24,00	-47,42	62,09
	I2	-116,00	33,00	-28,33	47,76
	Mnus4	-134,00	35,00	-37,67	56,33
	PEN	-97,00	32,00	-22,58	39,24
	ROS	-79,00	27,00	-24,08	32,11

Teste de Kruskal-Wallis antes da passagem celular

Variável	KW	valor-p
Linhagem	31,45	<0,001
Genótipo	2,24	0,32
Origem	0,51	0,47
Isolado	3,11	0,68

ANEXO 7b

Efeito Citóxico – após a passagem celular

Informações descritivas das variáveis após da passagem celular

Variável / Categoria		Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
LINHAGEM	CHO	-271,10	14,60	-47,15	66,82
	MDCK	-8,01	60,40	30,94	15,52
	VERO	-14,10	50,75	23,53	17,11
GENOTIPO	T3	-179,80	50,75	3,55	59,29
	T4	-271,10	40,42	-5,13	64,65
	T5	-72,80	60,40	8,91	32,79
ORIGEM	Ambiental	-271,10	60,40	-1,67	64,76
	Clinica	-141,90	43,77	6,55	40,05
ISOLADO	A3P4	-48,70	60,40	7,93	33,90
	DFNL	-141,90	43,77	6,36	52,56
	I2	-271,10	29,44	-13,67	85,79
	Mnus4	-179,80	50,75	,74	67,61
	PEN	-72,80	39,06	9,88	33,12
	ROS	-65,80	40,42	3,40	34,96

Teste de Kruskal-Wallis após a da passagem celular

Variável	KW	valor-p
Linhagem	41,95	<0,001
Genótipo	1,66	0,43
Origem	0,04	0,83
Isolado	1,77	0,87

ANEXO 7c
Efeito Citotóxico

Teste de Wilcoxon – verificação da existência de diferença significativa entre os dados antes e depois da passagem celular

Teste de Wilcoxon – comparação de todos dados antes e após a passagem

	Mínimo (% de destruição)	Máximo (% de destruição)	Média (% de destruição)	Desvio-padrão
Antes da passagem	-199,00	116,00	-27,28	50,11
Depois da passagem	-271,10	60,40	2,44	53,62

p < 0,001*

*O valor-p menor que 0,05 indica que existe diferença.

Teste de Wilcoxon – por variável, comparação dos dados antes e após a passagem

Variáveis	Isolados	Z	Valor-p*
Isolado	Mnus4	-1,961	0,05
	DFNL	-2,197	0,028
	I2	-1,255	0,209
	ROS	-2,118	0,034
	A3P4	-1,098	0,272
	PEN	-2,353	0,019
Genótipo	T3	-2,914	0,004
	T4	-2,257	0,024
	T5	-2,457	0,014
Linhagem	MDCK	-3,371	0,001
	VERO	-4,029	<0,001
	CHO	-0,886	0,376
Origem	Ambiental	-2,435	0,015
	Clínica	-3,849	<0,001

*O valor-p menor que 0,05 indica que existe diferença.

ANEXO 8

Efeito citopático

Teste Qui-dradado

Variáveis / Categorias	Grau 0		Grau 1		Grau 2		Grau 3		valor-p	
	N	N%	N	N%	N	N%	N	N%		
Isolado	Mnus4	135	70,3%	27	14,1%	22	11,5%	8	4,2%	<0,001
	Krt15.DFNL	137	71,4%	46	52,1%	5	2,6%	4	2,1%	
	I2	151	78,7%	22	11,5%	16	8,3%	3	1,6%	
	Krt12.ROS	107	55,7%	21	10,9%	36	18,8%	28	14,6%	
	A3P4	106	55,2%	15	7,8%	36	18,8%	35	18,2%	
	Krt16.PEN	109	56,8%	26	13,5%	32	16,7%	25	13,0%	
Inóculo	4 x 10 ⁴	406	70,5%	43	7,5%	68	11,8%	59	10,2%	<0,001
	10 x 10 ⁴	339	58,9%	114	19,8%	79	13,7%	44	7,6%	
Genótipo	T3	272	70,8%	73	19,0%	27	7,0%	12	3,1%	<0,001
	T4	258	67,2%	43	11,2%	52	13,5%	31	8,1%	
	T5	215	56,0%	41	10,7%	68	17,7%	60	15,6%	
Linhagem	MDCK	366	95,3%	1	0,3%	9	2,3%	8	2,1%	<0,001
	VERO	316	82,3%	37	9,6%	24	6,3%	7	1,8%	
	CHO	63	16,4%	119	31,0%	114	29,7%	88	22,9%	
Origem	Ambiental	392	68,1%	64	11,1%	74	12,8%	46	8,0%	0,035
	Clínica	353	61,3%	93	16,1%	73	12,7%	57	9,9%	

*O valor p menor que 0,05 indica que existe diferença.

Contagem de leitura dos poços

Descrição	Total de poços lidos
Total de poços de cada isolado para uma linhagem, cada dose e antes ou após passagem	16
Total de poços de cada isolado para uma linhagem, duas doses e antes ou após passagem	32
Total de poços lidos de cada isolado para uma linhagem:	64
Total de poços lidos para cada um dos três genótipos para uma linhagem	128
Total de poços lidos para cada origem para uma linhagem:	192
Total de poços lidos de cada isolado para as três linhagens:	192
Total de poços lidos para cada um dos três genótipos para as três linhagens	384
Total de poços lidos para cada origem para as três linhagens:	576
Total de poços lidos para cada linhagem celular:	384
Total de poços lidos para cada dose para as três linhagens	576

