

Ana Cristina Mansanaro Magliano

**Diversidade de *Acanthamoeba* spp no Brasil:
isolamento, aspectos fisiológicos, genotipagem e
relações filogenéticas entre isolados de ambiente e de
casos clínicos**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia da
Relação Patógeno-Hospedeiro do
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do título de
Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Biologia da
Relação Patógeno-Hospedeiro**

**Orientadora: Profa. Dra. Silvia
Celina Alfieri**

Versão original

**São Paulo
2011**

RESUMO

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

Amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* são protozoários ubiqüitários e frequentemente isolados do ambiente. Os trofozoítas são as formas de locomoção, nutrição e multiplicação que encistam quando as condições do meio são desfavoráveis. Os cistos resistem a dessecação e a vários agentes químicos e físicos, permanecendo viáveis durante muitos anos no ambiente. *Acanthamoeba* spp são agentes de infecções oportunistas geralmente fatais (encefalite granulomatosa, lesões cutâneas disseminadas) e também de ceratites (úlceras de córnea), que acometem indivíduos saudáveis, particularmente usuários de lentes de contato. Organismos do gênero *Acanthamoeba* foram inicialmente identificados com base em parâmetros morfológicos dos cistos e classificados em três grupos distintos (I, II e III). Atualmente, a identificação em nível de espécie é feita a partir do sequenciamento da subunidade menor do gene ribossômico (SSU rRNA); até o momento, 17 genótipos (T1-T17) albergam as espécies do gênero. Organismos do gênero *Acanthamoeba* são muito pouco investigados no Brasil, não se conhecendo a diversidade genética e o potencial patogênico das espécies prevalentes no país. No presente estudo, avaliamos 118 amostras de solo e água de diversas regiões do Brasil, o que resultou no estabelecimento de 38 culturas axênicas de *Acanthamoeba*, todas, atualmente, criopreservadas. A partir do sequenciamento parcial do SSU rRNA, foi possível genotipar e avaliar o polimorfismo genético entre os isolados de ambiente do Brasil, em análises que também incluíram seqüências de 11 isolados de casos clínicos brasileiros. Filogenias baseadas em diferentes métodos de análises mostraram que 25 isolados de ambiente e 11 isolados de ceratite pertencem ao clado/genótipo T4, indicando, à semelhança das observações de outros países, alta prevalência de isolados T4 no Brasil e forte associação deste genótipo com espécies patogênicas. Em particular, um isolado de água de torneira (ACC01) se mostrou filogeneticamente bastante relacionado a *A. polyphaga* ATCC 30461 (~99% de similaridade), espécie originária de um caso de ceratite (Texas, USA). Semelhanças fisiológicas (termo- e osmotolerância) e a secreção de níveis comparáveis de serina e cisteína peptidases também foram

observadas entre os dois isolados, o que indicou o possível potencial patogênico do isolado Brasileiro ACC01. Dentre os isolados de ambiente do Brasil, cinco foram agrupados com espécies do clado T5, formando um grupo monofilético e bem suportado (~2,3% divergência interna), até o momento fortemente associado à espécie *A. lenticulata*. Um único isolado, ARO04, se mostrou relacionado aos poucos isolados que formam o genótipo T13. O presente estudo também mostrou que sete isolados de ambiente do Brasil apresentam características morfológicas típicas das espécies do grupo morfológico I: cistos grandes com endocisto estrelado. Neste grupo estão as espécies mais divergentes do gênero *Acanthamoeba*, atualmente distribuídas em 4 genótipos (T7, T8, T9 e T16). Dos sete isolados Brasileiros do grupo morfológico I, um (TSP07) se mostrou filogeneticamente mais relacionado à *A. comandonii* (T9), enquanto que os demais agruparam com dois isolados do genótipo T17, com eles formando um clado monofilético (2,0% de divergência entre sequências) que, provavelmente, representa uma nova espécie do gênero *Acanthamoeba*. Indicadores indiretos de virulência (termo- e osmotolerância, secreção de peptidases e efeito citopático) foram examinados nos isolados dos genótipos T9 e T17, verificando-se: crescimento a temperaturas de até 40 °C, resistência em meios hiper-osmolares, secreção importante de atividade principalmente associada a serina peptidases e capacidade de produzir efeito citopático em monocamadas de células HeLa e SIRC; estes resultados sugerem o potencial patogênico deste grupo de isolados. Considerando a provável participação da atividade de uma subtilisina-*simile* na patogenia causada por *Acanthamoeba* e a disponibilidade da sequência completa de uma subtilisina de *A. healyi* (AhSUB), oligonucleotídeos que flanqueiam o domínio catalítico da subtilisina foram desenhados e utilizados para amplificar um fragmento de aproximadamente 800 pb. Dados iniciais de filogenias moleculares, incluindo um pequeno repertório de isolados de *Acanthamoeba*, indicam congruência das análises baseadas nos genes de subtilisina e SSU rRNA.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*, SSU rRNA, genotipagem, relações filogenéticas, serina peptidases, efeito citopático

ABSTRACT

MAGLIANO, A. C. M. **Diversity of *Acanthamoeba* spp in Brazil: isolation, physiological features, genotyping and phylogenetic relationships among environmental and clinical isolates.** 2011. Ph. D. Thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

Free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba* are worldwide distributed, being frequently isolated from the environment. *Acanthamoeba* grow and multiply as trophozoites, and encyst when the conditions become adverse. Cysts are highly resistant stages that remain viable for several years in the environment. *Acanthamoeba* spp can cause severe opportunistic infections (granulomatous encephalitis, disseminated skin lesions) as well as keratitis, an infection that affects healthy individuals, particularly contact lenses wearers. At the genus level, *Acanthamoeba* can be identified by their characteristic morphology, and classified according to cyst size and morphology in three morphological groups (I, II, and II). Identification at species level is currently based on analyses of SSU rRNA gene sequences, and 17 genotypes (T1-T17) have been identified. *Acanthamoeba* remain scarcely investigated in Brazil, and almost nothing is known about the genetic diversity and the pathogenic potential of the species prevalent in our country. This study examined the presence of *Acanthamoeba* in 118 Brazilian environmental samples, and established 38 new axenic cultures that have been cryopreserved. Genotyping of these environmental isolates and of 11 *Acanthamoeba* isolates from Brazilian cases of keratitis was performed by analyses of partial SSU rRNA gene sequences. Phylogenetic analyses by different methods were used to infer the relationships among the Brazilian and other *Acanthamoeba* isolates. Analyses assigned 25 of the new environmental isolates, and 11 Brazilian keratitis isolates in genotype T4, indicating the high prevalence of this genotype in Brazil, and its high association with keratitis cases. In particular, *Acanthamoeba* ACC01, a T4, Brazilian isolate was closely related to the keratitis-causing isolate, *A. polyphaga* ATCC 30461 (~99% similarity); comparison of both isolates indicated that they are thermotolerant, osmotolerant, and secrete comparable amounts of proteolytic enzymes associated with similar serine- and cysteine peptidases. These results point to the pathogenic potential of *Acanthamoeba* ACC01. Five Brazilian environmental isolates were assigned to genotype T5, a monophyletic and robustly supported clade (~2.3 % internal divergence)

associated to the species *A. lenticulata*. One Brazilian environmental isolate (ARO04) was assigned to genotype T13. This study also identified seven Brazilian environmental *Acanthamoeba* isolates that form large, star-shaped cysts; this is the hallmark of the highly divergent species classified in the morphological group I, and currently assigned to genotypes T7, T8, T9, and T17. One of these isolates is closely related to *A. comandoni* (genotype T9), while the other six group with two isolates of genotype T17, forming a monophyletic clade (2.0% sequence divergence) that likely represents a new *Acanthamoeba* species. Further characterization of the T9 and T17 Brazilian isolates indicated their osmotic resistance, and ability to grow at temperatures up to 40°C; also suggesting their pathogenic potential, medium conditioned by trophozoites induced pronounced cytophatic effects on SIRC and HeLa cells *in vitro*. The T17, and T9 isolates were also shown to secrete important levels of proteolytic activities associated mainly to serinepeptidases. Serine peptidases play important roles in *Acanthamoeba* pathogenicity and a subtilisin gene from *A. healyi* has been cloned and sequenced (AhSUB). Degenerated primers targeting the catalytic domain of AhSUB gene were designed and used to amplify fragments of ~800 bp. Preliminary data from a small number of *Acanthamoeba* isolates suggest congruence between SSU rRNA- and AhSUB-based phylogenies.

Key-words: *Acanthamoeba*, SSU rRNA, genotyping, relationship phylogeny, serine peptidases, cytophatic effect

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Amebas de vida livre potencialmente patogênicas

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários amplamente dispersos na natureza. Foram isoladas pela primeira vez em 1913 (PUSHKAREW, 1913), mas seu envolvimento em patologia humana só foi reconhecido em meados da década de 1960, quando casos fatais de meningoencefalite foram descritos na Austrália. (FOWLER E CARTER, 1965). Sabe-se atualmente que AVLs dos gêneros *Acanthamoeba* (focalizadas no presente estudo), *Balamuthia*, *Naegleria* e *Sappinia* são organismos aeróbios de ampla distribuição geográfica e que algumas espécies são patogênicas para o homem e vários outros animais (MARTINEZ, 1985; MARTINEZ E VISVESVARA, 1997; SCHUSTER E VISVESVARA, 2004; VISVESVARA E MAGUIRE, 2006). Pelo fato de terem o meio ambiente como “habitat” natural (existindo, portanto, como organismos de vida livre), ocasionalmente invadindo e colonizando um hospedeiro, essas AVLs são também chamadas de amebas anfitriônicas (PAGE, 1988). A capacidade de sobreviver e proliferar às temperaturas do hospedeiro, de persistir nas mucosas do hospedeiro e também a dose infectante e fenômenos associados à imunidade da mucosa e à imunodeficiência do hospedeiro são fatores considerados importantes para o estabelecimento da infecção por AVLs (FERRANTE, 1991; KHAN 2006).

Espécies dos gêneros *Acanthamoeba* e a espécie *Balamuthia mandrillaris* são causadores de encefalite amebiana granulomatosa, de infecções pulmonares e de pele, que acometem principalmente indivíduos imunodeprimidos ou debilitados. *Acanthamoeba* também provoca uma grave doença que compromete a visão (ceratite), que incide principalmente em usuários de lente de contato. Entre as quarenta espécies descritas no gênero *Naegleria*, apenas *Naegleria fowleri* causa uma meningoencefalite aguda hemorrágica e fulminante, levando à morte indivíduos saudáveis com história de contato recente com água contaminada (MARTINEZ E VISVESVARA, 1997; SCHUSTER E VISVESVARA, 2004; VISVESVARA E MAGUIRE, 2006). Recentemente, *Sappinia diploidea*, uma AVL normalmente encontrada em solo contaminado com fezes de alces, bisões e gado, foi identificada como a espécie causadora de encefalite em um homem jovem e saudável (GELMAN et al., 2001).

Provavelmente, outras amebas capazes de causar doenças em humanos serão futuramente descritas.

Como a maioria das infecções causadas por AVLs é fatal, o diagnóstico é, muitas vezes, feito *postmortem*, mesmo em países desenvolvidos, onde sofisticados métodos diagnósticos estão disponíveis.

1.2 O Gênero *Acanthamoeba*

Em 1913, Pushkarew isolou uma ameba de poeira e a nomeou *Amoeba polyphagus*. Em 1930, Castellani isolou um contaminante de uma placa de cultura de leveduras, uma ameba hoje designada *Acanthamoeba castellanii*. Atualmente, existem mais de 24 espécies de *Acanthamoeba* identificadas com base em critérios morfológicos.

Acanthamoeba spp. são, provavelmente, os protozoários de vida livre mais abundantes no ambiente (PAGE, 1988; MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003); apresentam ampla distribuição geográfica, sendo frequentemente isoladas de solo, coleções de água, esgoto, amostras de ar atmosférico, poeira, sistemas centrais de ar condicionado e equipamentos hospitalares, bem como de uma grande variedade de organismos, incluindo peixes, répteis, pássaros, mamíferos (gorilas, cangurus, cachorro etc.) e seres humanos (SCHUSTER E VISVESVARA, 2004, KHAN, 2006, VISVESVARA et al., 2007, SRIRAM, et al., 2008). Já foi demonstrado que mais de 80% de indivíduos norte-americanos saudáveis possuem anticorpos contra *Acanthamoeba*, o que indica ser muito frequente a exposição humana a este protozoário (CURSONS et al., 1980, BRINDLEY et al., 2009).

1.2.1 Morfologia geral e ciclo de vida de *Acanthamoeba*

Acanthamoeba spp apresentam duas formas evolutivas: trofozoítos, formas multiplicativas, de locomoção e nutrição (que se dá principalmente pela fagocitose de microrganismos), e cistos, formas de resistência que favorecem a perpetuação e a dispersão dos organismos no ambiente.

As formas trofozoítas apresentam único núcleo, com nucléolo centralizado bem evidente, e grande número de vacúolos no citoplasma, entre os quais um, de natureza

contrátil, é responsável pela regulação osmótica; os demais vacúolos são de natureza digestiva (BOWERS E KORN, 1968, PAGE, 1988). A locomoção de trofozoítas ocorre de forma semelhante, independentemente da superfície de contato (se interface água-ar ou substrato sólido). O trofozoíta é impulsionado por projeções de pequeno diâmetro (contatos focais), disso resultando a emissão de expansões finas do citoplasma (os acantopódios), também utilizadas para a captura de alimentos (PRESTON et al., 2001).

O encistamento, parte natural do ciclo de *Acanthamoeba*, ocorre normalmente quando as condições do ambiente tornam-se adversas, por exemplo, com a redução das fontes de carbono e outros nutrientes ou mudanças bruscas de temperatura e pH (NEFF E NEFF, 1969, PAGE, 1988). Em cultura, o encistamento pode ser induzido pelo empobrecimento do meio ou com a transferência de trofozoítas para soluções hiperosmolares (NEFF et al., 1964). Durante o processo, que requer oxigênio, cálcio e magnésio, modifica-se o metabolismo celular, ocorrendo, concomitantemente, diminuição da massa citoplasmática, gradual desidratação do organismo e síntese da dupla parede do cisto: primeiramente, há formação da parede externa (ectocisto - composto principalmente por proteínas) e, em seguida, da parede interna (endocisto - que contem celulose) (BOWERS E KORN, 1969, WEISMAN 1976). Cistos de *Acanthamoeba* spp. têm a capacidade de tolerar uma variedade de agentes físicos (altas temperaturas, congelamento, radiação ultravioleta) e químicos (desinfetantes, antimicrobianos e poluição ambiental, incluindo metais pesados, herbicidas e pesticidas) que possam existir em seu “habitat” natural (MAZUR et al., 1995, AKSOZEK et al., 2002, HEASELGRAVE et al., 2006). Além disso, já foi mostrado que os cistos de *Acanthamoeba* podem resistir a dessecação por mais de 20 anos, permanecendo viáveis e infectantes (SRIRAM et al., 2008). A grande resistência das formas císticas provavelmente explica a abundância e o isolamento frequente de *Acanthamoeba* das mais variadas coleções de água (de torneira, piscina, mar), solo, poeira etc. (CULBERTSON, 1971, SCHUSTER E VISVESVARA, 2004, IBRAHIM et al., 2007, GIANINAZZI et al., 2009, MAGLIANO et al., 2009).

Os cistos são compostos por diversas proteínas e celulose (que representa 10% de seu peso). Apresentam um opérculo, estrutura tida como ponto de saída do trofozoíta ao desencistar, o que ocorre quando as condições são favoráveis (SCHUSTER E VISVESVARA, 2004, KHAN, 2006). Diversas moléculas que fazem parte do complexo processo gradual de encistamento já foram identificadas, entre as quais duas serinas peptidases: (EMSP) e uma proteína específica do processo de encistamento (CSP21)

além de celulose sintase I e II (CSI e CSII) e glicogênio fosforilase (GP) (HIRUKAWA et al. 1998, MOON et al. 2008, POTTER E WEISMAN 1971, LORENZO-MORALES et al. 2008)

Recentemente, foi demonstrado que a exposição de *Acanthamoeba* a concentrações relativamente baixas de solventes orgânicos induz uma resposta celular imediata que leva a formação de um revestimento simples na superfície do trofozoíta, chamado de pseudocisto. À primeira vista, a formação desse revestimento pode parecer um processo mais acelerado de encistamento, mas que, entretanto, difere em vários aspectos de um cisto propriamente dito. A expressão do gene CSP21 não foi detectada em nenhum momento durante a formação de pseudocistos, os quais, por outro lado, se mostram menos resistentes ao calor, dessecação e a baixos valores de pH. Além disso, análises de ultraestrutura indicam ausência da parede interna (endocisto), característica marcante e sempre presente em um cisto de *Acanthamoeba*, sugerindo, portanto, que a formação do pseudocisto e o encistamento propriamente dito são dois fenômenos distintos que podem ser ativados sob condições externas específicas (KLIESCIOVA et al., 2011a e b).

1.2.2 Importância médica e epidemiológica de organismos do gênero *Acanthamoeba*

1.2.2.1 *Acanthamoeba* como reservatórios de patógenos encontrados no ambiente

Embora acantamebas sejam facilmente cultivadas em meios axênicos há 50 anos ou mais (NEFF, 1957 e 1958), na natureza, a fagotrofia é a principal forma de nutrição desses protozoários. Mast e Doyle (1934) foram os primeiros a mostrar que a fagocitose é o modo normal de alimentação das amebas e que a pinocitose é observada em resposta a uma dieta líquida. A nutrição por fagocitose é desencadeada pelo reconhecimento e adesão, seguida da internalização e destruição de microorganismos, mecanismos que ainda permanecem pouco explorados em *Acanthamoeba*. Sabe-se que trofozoítas fagocitam de forma seletiva, havendo, portanto, preferência por certas partículas (RABINOVITCH E DE STEFANO, 1971) e substratos bacterianos (BOTTONNE et al., 1994). Estudos de interação acantameba-bactéria apontam para *Stenotrophomonas maltophilia*, *E. coli* K-12 e *Enterobacter aerogenes* como as melhores fontes de

nutrientes (WEEKERS et al., 1995; BOTTONE et al., 1994; WANG E AHEARN, 1997; DE MORAES E ALFIERI, 2008).

A interação *Acanthamoeba*-bactéria ganhou importância em anos mais recentes com a observação de que vários patógenos resistem e sobrevivem no interior de trofozoítas e cistos (BROWN E BARKER, 1999; WINIECKA-KRUSNELL E LINDER, 1999, 2001; HUWS et al., 2008). A descoberta de que *Legionella pneumophila*, bactéria responsável por pneumonites humanas, podia ser isolada da água de condicionadores de ar levou à demonstração de que a bactéria sobrevive e prolifera em *Acanthamoeba* sp (RODRIGUEZ-ZARAGOZA, 1994; ADELEKE et al., 1996). Além disso, é fato hoje bem documentado que a virulência de bactérias, como *L. pneumophila* e *Mycobacterium avium*, aumenta após o ciclo intracelular (CIRILLO et al., 1994; 1997; 1999; GREUB E RAOULT, 2004). Culturas de *Acanthamoeba* podem também ser infectadas por patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium*, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *Vibrio cholera*, *Salmonella tryphimurium*, *Burkholderia cepacia* (revisões: GREUB E RAOULT, 2004, THOMAS et al., 2010).

As mesmas bactérias presentes em trofozoítas podem ser encontradas em cistos (KILVINGTON E PRICE, 1990; YAGITA et al., 1995). Steinert et al. (1998) descreveram a presença de bactérias viáveis na parede (*Mycobacterium avium*) e em vacúolos (*Legionella pneumophila*) de cistos de *A. polyphaga*. A localização de microorganismos em cistos é de extrema relevância devido à resistência de cistos a agentes desinfetantes, o que protege as bactérias alojadas em seu interior (DE JONCKHEERE E VAN DE VOORDE, 1976; DE JONCKHEERE 1991; CHANG et al., 1985).

1.2.2.2 Potencial patogênico de *Acanthamoeba*

Além de atuarem como reservatórios de patógenos no ambiente, várias espécies de *Acanthamoeba* adquiriram importância médica, como agentes de infecções em humanos.

A patogenicidade de *Acanthamoeba* para camundongos foi descrita por Culbertson em 1958, que observou a morte em 3 a 4 dias de animais inoculados experimentalmente com uma cultura de células acidentalmente contaminada por trofozoítas. Os animais rapidamente desenvolveram um processo infeccioso do sistema

nervoso central, conseqüência de uma invasão disseminada de trofozoítas. Os primeiros casos humanos de infecção por *Acanthamoeba* (encefalites e ceratites) foram claramente diagnosticados nos anos 1970 (MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003; NAGINGTON et al., 1974). Em anos mais recentes, ceratites causadas por outras amebas de vida livre, como *Vahlkampfia*, *Hartmannella* e *Vannella* foram também descritas (AITKEN et al., 1996, SCHUSTER E VISVESVARA, 2004). Casos de acantamebíase disseminada em pacientes com AIDS (sinusites, rinites, pneumonias e infecções cutâneas envolvendo ou não o sistema nervoso central) adquiriram importância mais recentemente (MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003, KHAN, 2006, VISVESVARA, 2010, SIDIQI, 2011).

A encefalite granulomatosa causada por *Acanthamoeba* (AGE) é uma infecção de curso lento e progressivo, levando, na grande maioria dos casos, ao óbito dos pacientes. Trata-se de infecção oportunista que acomete indivíduos imunologicamente comprometidos, submetidos à terapia imunossupressora ou infectados pelo vírus HIV (MARTINEZ, 1982, 1985; FERRANTE, 1991; SISON et al., 1995; MARCIANO-CABRAL et al., 2000, VISVESVARA, 2010, SIDIQI, 2011). Os sinais e sintomas da infecção incluem dores de cabeça, convulsões, alterações comportamentais, náusea, febre, vômito, rigidez de nuca, letargia e aumento da pressão intracraniana. Autópsias revelam edema cerebral, áreas corticais e gânglios basais edemaciados e múltiplas áreas de necrose hemorrágica nos tecidos do SNC. O tronco cerebral, hemisférios cerebrais e cerebelo podem apresentar áreas de infartos hemorrágicos. Exames histológicos revelam a presença de células gigantes multinucleadas nos hemisférios cerebrais, tronco cerebral, mesencéfalo, cerebelo e gânglio basal. Tecido necrótico com lipídios contendo macrófagos e neovascularização sugerindo um tumor é muitas vezes visto. Trofozoítos e cistos são geralmente encontrados no tecido (VISVESVARA, 2007, 2010).

Ao contrário da encefalite, a ceratite por *Acanthamoeba* (AK – *Acanthamoeba keratitis*) ocorre em indivíduos imunologicamente competentes, particularmente, mas não exclusivamente, em usuários de lentes de contato (SCHUSTER E VISVESVARA, 2004). Apesar de vários casos terem sido relatados no Brasil (SOUSA et al., 2008; CARVALHO et al, 2009, 2010), não há estatísticas que permitam concluir sobre a incidência de ceratites por *Acanthamoeba* no país. Alguns estudos associam a maior incidência de AK em alguns países aos seguintes fatores: utilização de lentes de contato (mais comum em países desenvolvidos); a presença de cepas mais virulentas de

Acanthamoeba; clima; tratamento e qualidade da água que abastece as regiões; a resistência e a ampla distribuição de cistos no ambiente (IBRAHIM et al., 2007).

A ceratite por *Acanthamoeba* é uma doença dolorosa que se caracteriza pela destruição progressiva dos tecidos da córnea. O quadro clínico pode, nos estágios iniciais, ser facilmente confundido com ceratites virais, bacterianas ou fúngicas. A característica clínica mais evidente de AK é a presença de um infiltrado em forma de anel, que pode conter células inflamatórias tais como neutrófilos (MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003). O diagnóstico de AK se dá a partir do isolamento de *Acanthamoeba*, tanto das lentes de contato quanto de material colhido por raspado de córnea. O uso da microscopia confocal já foi bastante útil no diagnóstico de ceratite por *Acanthamoeba* (WINCHESTER et al., 1995). Atualmente, os métodos baseados em PCR usando o gene SSU rRNA como alvo foram desenvolvidos para a detecção rápida de *Acanthamoeba*. Este método é altamente específico e sensível, podendo detectar menos de cinco trofozoítas/cistos por amostra (LEHMANN et al, 1998; KHAN et al, 2001; SCHROEDER et al, 2001).

Alguns fatores são cruciais e bem estabelecidos como riscos para o desenvolvimento da doença em usuários de lente de contato. O uso prolongado de uma mesma lente de contato ocasiona seu desgaste e, conseqüentemente, a deixa porosa; de fato, Beattie et al. (2003) mostraram maior adesão de *Acanthamoeba* a lentes de contato usadas, em comparação com lentes de contato novas. Testes realizados em lentes de contato usadas mostraram a presença de diversos sacarídeos (manose, glicose, galactose, fucose, N-acetil-D-glucosamina e N-acetil-D-galactosamina), ácido siálico, glicoproteínas, lipídios, mucinas, polissacarídeos, cálcio, ferro, silício, magnésio, sódio, lactoferrina, lisozima e imunoglobulina do tipo IgG, o que propicia maior adesão de trofozoítas (TRIPATHI E TRIPATHI, 1984; GUDMUNDSSON et al, 1985; KLOTZ et al, 1987).

Existem alguns estudos que demonstraram que o trauma da córnea é uma condição que facilita a infecção por *Acanthamoeba*. Animais com córneas intactas aparentemente não desenvolvem a infecção (CHANG E SOONG, 1991 NIEDERKORN et al., 1999). Por outro lado, a falta de higiene e/ou limpeza inadequada das lentes propicia a formação de biofilmes bacterianos (fonte de nutrientes para *Acanthamoeba*), enquanto que a exposição a águas contaminadas certamente aumenta o risco de infecção (IBRAHIM et al., 2007).

Dada a resistência a vários quimioterápicos e agentes utilizados na higienização de lentes de contatos, a presença de cistos na lesão claramente dificulta o tratamento das ceratites (MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003). Recentemente, Kliescikova (2011a) descreveu a formação de um pseudocisto (já discutido no item 1.2.1) de *Acanthamoeba* durante a exposição ao polipropileno glicol, uma substância que atua como lubrificante e controlador osmótico que é amplamente utilizada por diversas indústrias farmacêuticas no preparo de soluções para higienização de lentes de contato.

Com relação ao tratamento, o prognóstico para a ceratite causada por *Acanthamoeba* melhorou consideravelmente nos últimos anos, provavelmente devido à melhora no diagnóstico e início mais precoce do tratamento. A grande problemática no que se refere a AK ainda continua sendo a resistência dos cistos ao tratamento, o que pode levar à recorrência da infecção. Os cistos, por causa de sua dupla parede e a presença de celulose na parede interna, são bastante resistentes às drogas atualmente recomendadas para o tratamento das ceratites por *Acanthamoeba*: polihexametileno biguanida (PHMB), clorohexidina, diamidinas, isotionato de propamidina (Brolene) e hexamidina (Desomedine). O tratamento da infecção ocular é difícil e de longo prazo. As drogas são utilizadas no início do tratamento de hora em hora por até 3 dias, seguindo-se um período de gradual redução e etapa de manutenção, quando uma mistura de drogas é utilizada apenas uma vez ao dia.

O tratamento das infecções disseminadas (oportunistas) é complicado e frequentemente mal sucedido, mesmo em esquemas de combinação de drogas (itraconazol, azitromicina, 5-fluorocitosina, rifampicina, anfotericina B). Alguma eficácia é conseguida quando o diagnóstico é precoce e a quimioterapia instituída antes que o parasita atinja o sistema nervoso central (MARCIANO-CABRAL E CABRAL 2003, BARETE et.al., 2007, LACKNER, et. al., 2010)

1.3 Fisiopatologia das infecções causadas por *Acanthamoeba*

Os mecanismos que determinam a patogenia de *Acanthamoeba* ainda não estão suficientemente esclarecidos, conhecendo-se ainda pouco sobre a progressão das lesões no sistema nervoso central (SNC) e mais sobre a infecção ocular.

A passagem nasal e o sangue são rotas possíveis da infecção cerebral, mas a ampla distribuição das lesões cerebrais, o grande número de parasitas encontrados no

espaço perivascular do parênquima cerebral bem como em vários outros órgãos indicam ser mais provável a disseminação via hematogênica, apesar de existirem relatos de indivíduos imunocomprometidos com infecções cutâneas disseminadas que não desenvolveram a infecção no SNC (KHAN, 2008, VISVESVARA E MAGUIRE, 2006). Acredita-se que a infecção humana possa ocorrer via trato respiratório, que conduz o parasita aos vasos sanguíneos alveolares e destes para vários órgãos/tecidos, e também por lesões cutâneas, a partir das quais o parasita pode atingir a circulação. Existem evidências de que a invasão do SNC se dê pela barreira hemato-encefálica (KHAN, 2008, VISVESVARA E MAGUIRE, 2006, VISVESVARA et al., 2007).

Algumas moléculas já identificadas desempenham um papel chave na patogênese da encefalite por *Acanthamoeba*. Entre elas estão uma proteína ligadora de manose (MBP), responsável pela adesão do trofozoíta a célula alvo, que aciona uma cascata de sinalização associada a proteínas Rho, e uma serina peptidase que atua na degradação de proteínas estruturais do cérebro contribuindo para a progressão da lesão no SNC (KHAN, 2008, VISVESVARA E MAGUIRE, 2006, SIDIQI, 2011).

No que se refere à infecção ocular, os estudos demonstram que a adesão de trofozoítas a glicoproteínas manosiladas do epitélio da córnea é mediada por uma proteína (136 kDa) ligadora de manose (GARATE et al., 2004, 2005) e que a adesão desencadeia a cascata patogênica da ceratite: destruição do epitélio da córnea; penetração da membrana de Bowman; e degradação de colágeno, a principal proteína estrutural do estroma (MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003; CLARKE E NIEDERKORN, 2006). A adesão de trofozoítas induz a secreção do fator de virulência MIP 133 (“manose induced protein” 133), uma serina peptidase de 133 kDa. A MIP 133 induz apoptose de queratócitos, de células da íris, epiteliais pigmentares da retina e epiteliais e endoteliais da córnea (CLARKE E NIEDERKORN, 2006). A ausência de MIP 133 em isolados de *Acanthamoeba* considerados não patogênicos reforça seu envolvimento na cascata patogênica da ceratite. Pelo menos um trabalho descreve secreção induzida de metalopeptidases (CAO et al., 1998), o que também sugere o envolvimento de outras proteases nos instantes iniciais da infecção.

Contribuem para a destruição dos tecidos e o processo de invasão a atividade fagocítica de *Acanthamoeba* e efeitos citopáticos produzidos por moléculas liberadas por trofozoítas, principalmente peptidases (MATTANA et al., 2002; ALSAM et al., 2005; MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003; CLARKE E NIEDERKORN, 2006; KHAN, 2006). Trofozoítas de várias espécies de *Acanthamoeba* secretam

constitutivamente enzimas proteolíticas, incluindo: um fator ativador de plasminogênio, que foi purificado a partir de sobrenadantes de cultura de *A. castellanii* (MITRA et al., 1995); serina peptidases (FERRANTE E BATES, 1988; HE et al., 1990; MITRO et al., 1994; ALFIERI et al., 2000; KONG et al., 2000; HONG et al., 2000; NA et al., 2001, 2002; KIM et al., 2003; CLARKE E NIEDERKORN, 2006; FERREIRA et al., 2009); cisteína peptidases (HADAS E MAZUR, 1993; MITRO et al., 1994; ALFIERI et al., 2000) e, possivelmente, metalopeptidases (MITRO et al., 1994; ALFIERI et al., 2000; FERREIRA et al., 2009, SISSONS et al. 2006; MAGLIANO et al., 2009)

Evidências experimentais indicam que serina peptidases constitutivamente secretadas contribuem diretamente para o dano celular (CAO et al., 1998; LEHER et al., 1998; KHAN et al., 2000; ALSAM et al., 2005; CLARKE E NIEDERKORN, 2006; KIM et al., 2006). Por degradarem uma variedade de substratos proteicos (imunoglobulinas, interleucinas, inibidores endógenos de serina peptidases, elastina, fibronectina, colágenos tipo I e IV), facilitam a invasão dos tecidos e a evasão da resposta imune do hospedeiro (CHO et al., 2000; KONG et al., 2000; NA et al., 2001; CLARKE E NIEDERKORN, 2006; KIM et al., 2006; ALIZADEH et al., 2008; FERREIRA et al., 2009). Para alguns autores, a degradação do colágeno, principal proteína estrutural da córnea, resulta da ação de várias collagenases não específicas (CLARKE E NIEDERKORN, 2006), incluindo serina peptidases da família das subtilisinas (~33 kDa), elastases, cisteína peptidases (65 kDa) e metalopeptidases.

1.4 Marcadores indiretos de virulência

O potencial patogênico de isolados de *Acanthamoeba* pode ser avaliado diretamente, mediante inoculação intranasal em camundongos (modelo de encefalite) ou aplicação em córnea de coelho previamente lesada (modelo de ceratite) (MARTÍNEZ 1985; HE et al., 1990). Por serem procedimentos de execução mais lenta que requerem a utilização de animais, muitos estudos utilizam indicadores indiretos de virulência previamente validados em experimentos simultaneamente realizados com modelos animais. Estes incluem:

A) Capacidade/facilidade de adaptação a condições de estresse. Isolados patogênicos normalmente crescem a temperaturas mais elevadas (34, 37 ou mesmo 40°C) e são osmotolerantes, isto é sobrevivem/proliferam quando transferidos para

meios hiperosmolares (KHAN 2000; KHAN E PAGET 2001; KHAN E TAREEN 2003, MAGLIANO et al., 2009).

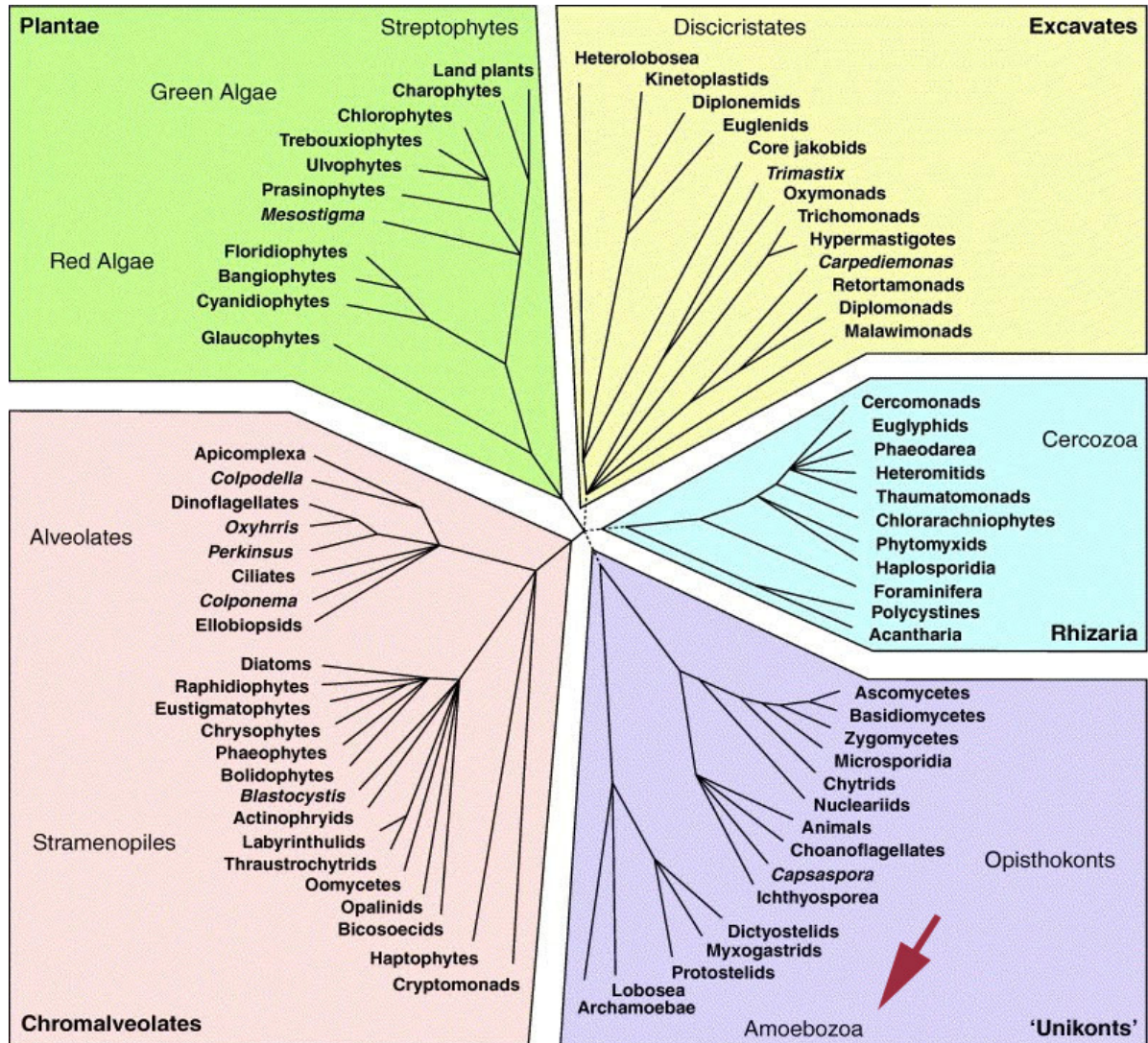
B) Capacidade de produzir efeito citopático, isto é, destruição de monocamadas de células. Nestes ensaios, trofozoítas ou meios condicionados por trofozoítas são incubados com linhagens celulares (por exemplo, células SIRC – fibroblastos de córnea de coelho, células Vero ou LLC-MK2). Um isolado pode ser considerado não patogênico, pouco ou muito patogênico de acordo com a extensão da destruição observada em monocamadas celulares.

C) Secreção importante de atividade associada a serina peptidases. Apesar da diversidade de peptidases secretadas, a função de serina peptidases parece ser a mais relevante, pois contribuem para o efeito citopático (CAO et al. 1998; LEHER et al. 1999; HURT et al. 2003) e também são capazes de degradar proteínas do hospedeiro (KONG et al. 2000; NA et al. 2001). Embora se saiba que isolados patogênicos e não patogênicos secretam peptidases de forma constitutiva, isolados patogênicos caracterizam-se pela secreção aumentada de serina peptidases (KHAN, 2006), cuja atividade pode destruir monocamadas de células de várias linhagens, incluindo as de córnea de coelho e epiteliais da córnea humana (CAO et al., 1998; LEHER et al., 1998; HURT et al., 2003; KIM et al., 2006; SISSONS et al., 2006).

1.5 Taxonomia e classificação de organismos do gênero *Acanthamoeba*

A classificação taxonômica clássica dividiu os protozoários em quatro grandes grupos: Sarcodina (amebas), Mastigóforos (flagelados), Sporozoa (a maioria dos protozoários parasitas) e Infusoria (ciliados). Esta taxonomia foi totalmente abandonada pela Sociedade Internacional de Protozoologistas que introduziu a nova classificação, baseada na abordagem contemporânea das filogenias moleculares (Adl et al., 2005). Com isso, os sistemas hierárquicos que agrupavam os organismos em reinos, filos, classes, subclasses, super-ordens e ordens cederam lugar a uma nova classificação, que agora agrupa os eucariontes em seis grandes grupos ou Super-Grupos: Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Plantae, Chromalveolata e Excavata (Figura 1). Os quatro gêneros de AVLs potencialmente patogênicas ao homem foram classificados em dois super grupos, Amoebozoa e Excavata, como segue: (a) *Acanthamoeba* e *Balamuthia* estão classificadas no super-grupo Amoebozoa, sub-divisão Acanthamoebidae; (b)

Sappinia no super-grupo Amoebozoa, sub-divisão Thecamoebidae: Flabellinea; e (c) *Naegleria fowleri* no super-grupo Excavata, Heterolobosia: Vahlkampfiidae. Importante salientar que este esquema foi proposto como base para as futuras (e necessárias)



revisões.

Figura 1. Árvores dos eucariotos baseadas na nova nomenclatura proposta pela Sociedade Internacional de Protozoologistas.

Fonte: KEELING, et. al., 2005.

1.5.1 Classificação de organismos do gênero *Acanthamoeba* baseada em parâmetros morfológicos

Durante muitos anos, a classificação de amebas do gênero *Acanthamoeba* esteve apoiada apenas em parâmetros morfológicos, que levavam principalmente em conta o tamanho e a morfologia de cistos. Isto certamente gerou atribuição de nomes distintos para organismos da mesma espécie ou de um mesmo nome a outros que, na realidade, podem corresponder a espécies distintas. A classificação morfológica proposta por Pussard e Pons (1977), subdividiu o gênero em três grupos morfológicos distintos (I, II, III). As espécies definidas no grupo morfológico I (*A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. tubiashi*) são as que apresentam cistos de maiores dimensões (diâmetro médio >18 µm), sendo o endocisto caracteristicamente estrelado e o ectocisto liso. No grupo II, que abriga a maioria das espécies de *Acanthamoeba* (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. triangularis*, *A. divionensis* (= *A. parativionensis*), *A. mauritaniensis*, *A. lugdunensis* e *A. quina*), os cistos (diâmetro médio <18 µm) apresentam ectocisto irregular e o endocisto com forma variável, podendo ser poligonal, triangular ou oval. No grupo III estão as espécies cujos cistos têm diâmetro médio <19 µm (*A. culbertsoni*, *A. healyi*, *A. jacobsi*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa*, *A. royreba*), sendo o ectocisto liso e o endocisto em forma que varia de poligonal a oval (MARCIANO-CABRAL E CABRAL 2003).

1.5.2 Classificação de organismos do gênero *Acanthamoeba* baseada em sequências de SSU rDNA

Em anos mais recentes, a identificação e a taxonomia de *Acanthamoeba* spp. começou a ser revisada com base em filogenias moleculares que utilizam principalmente sequências da subunidade menor (SSU) do rRNA como marcadores moleculares. A abordagem molecular definiu, até o momento, 17 genótipos (T1 a T17) no gênero *Acanthamoeba* (STOTHARD et al., 1998, HORN et al., 1999; GAST, 2001; HEWETT et al., 2003, CORSARO E VENDITTI, 2010; NUPRASERT et al. 2010).

1.5.2.1 O Gene ribossômico

Os eucariotos compartilham um DNA ribossômico (rDNA) que apresenta uma estrutura complexa e distinta, frequentemente utilizada em inferências de relacionamento filogenético (HILLIS E DIXON, 1991).

As seqüências do gene ribossômico têm-se revelado úteis em análises filogenéticas e evolutivas uma vez que esta região é equivalente em todos os organismos conhecidos (SOGIN et al., 1986). Além disso, diferentes regiões do gene ribossômico exibem diferentes graus de variabilidade, sendo possível analisar regiões variáveis ou conservadas para inferências filogenéticas (HILLIS E DIXON, 1991). As regiões conservadas são úteis na construção de oligonucleotídeos que permitem amplificar por PCR o gene ribossômico de organismos distintos. A subunidade menor do gene ribossômico (SSU) tem sido utilizada com muita frequência em análises filogenéticas de protozoários devido à facilidade de amplificação por PCR e presença de regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas, que são fundamentais para a obtenção de alinhamentos confiáveis. Estas características tornaram a utilização de seqüências do gene ribossômico uma excelente ferramenta em estudos filogenéticos e evolutivos.

Os genes nucleares de rDNA de *Acanthamoeba* (Fig. 2) possuem uma estrutura característica e já foi determinado que a unidade de repetição do cistron ribossômico é de cerca de 12.000 pares de base (pb). O número de unidades de repetição parece ser em torno de 600 cópias no genoma (BYERS et al.1990). A subunidade maior (LSU rDNA) está subdividida em dois segmentos de 2.400 pb (LSU a) e 2.000 pb (LSU b), separados por um espaçador interno transcrito (ITS) de cerca de 200 pb, que é removido do transcrito primário.

O RNA da subunidade menor de *Acanthamoeba* tem um tamanho de cerca de 2.300 a 2.700 pb dependendo da espécie.

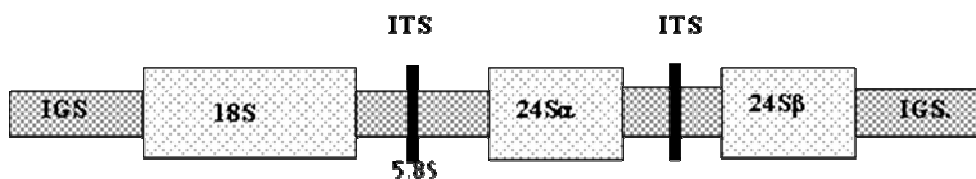


Figura 2– Esquema do cistron ribossômico em *Acanthamoeba* spp

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

O desenvolvimento de ferramentas da biologia molecular, tais como análise do DNA mitocondrial (BOGLER et al., 1983), RNA ribossômico (GAST et al., 1996; STOTHARD et al., 1998), RADP (ALVES et al., 2000) e dot-blot reverso (GAST et al., 2001) contribuíram significativamente para a classificação em nível de espécies de *Acanthamoeba*. Dos métodos propostos, o adotado atualmente é a classificação/genotipagem feita pela análise do SSU rDNA. A técnica, inicialmente descrita por GAST et al. (1996), foi muito bem explorada no estudo pioneiro de Stothard et al. (1998), que culminou com a classificação de 53 isolados de *Acanthamoeba* em 12 tipos de sequências ou genótipos (T1 a T12), separados por divergência > 5 % entre as sequências (divergência \leq 5 % colocam os isolados em um mesmo genótipo). Posteriormente, diferentes pesquisadores estabeleceram outros cinco genótipos, totalizando, até o momento, 17 genótipos (T1 a T17) no gênero *Acanthamoeba* (STOTHARD et al., 1998, HORN et al., 1999; GAST, 2001; HEWETT et al., 2003, CORSARO E VENDITTI, 2010; NUPRASERT et al., 2010). A integração dos grupos morfológicos com os dados de sequência e a possível correlação entre genótipos e doença está relacionada na Tabela 1.

O número de sequências de SSU rRNA disponíveis aumentou significativamente nos últimos anos, revelando alta prevalência de organismos do genótipo T4 no ambiente e, também, uma forte associação de T4 com a imensa maioria (~90%) dos casos de ceratite (MAGSHOOD et al., 2005). Poucos casos de infecção ocular foram até o momento associados a outros genótipos (STOTHARD et al., 1998; WALOCHNIK et al., 2000; LEDEE et al., 1996, 2009; SPANAKOS et al., 2006). Se a associação de T4 com ceratite simplesmente decorre da alta prevalência de T4 no ambiente ou indica maior virulência das espécies desse genótipo é aspecto que ainda deverá ser esclarecido.

Tabela 1. Relação entre grupos morfológicos, genótipos e patologias associadas a humanos

| Grupo morfológico | Genótipo | Patologia associada |
|--------------------------|-----------------|----------------------------|
| II | T1 | Encefalite |
| II | T2/T4 | Encefalite e Ceratite |
| II | T3 | Ceratite |
| III | T5/T10 | Encefalite e Ceratite |
| III | T6/T15 | Ceratite |
| I | T7/T8/T9/T17 | NA ^b |
| II | T11 | Ceratite |
| II | T12 | Encefalite |
| ND ^a | T13 | Ceratite |
| II | T14 | Ceratite |
| ND ^a | T16 | Ceratite |

^a ND, grupo morfológico não definido

^b NA, genótipos não relacionados a infecção em humanos

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2. - Genotipagem, caracterização biológica e bioquímica de *Acanthamoeba* sp ACC01 isolada de água de torneira, São Paulo, SP, Brasil. (Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp isolated from tap water in Brazil).

Este trabalho é o primeiro a detalhar a caracterização biológica, molecular e bioquímica de um isolado de ambiente brasileiro (ACC01), filogeneticamente relacionado (99 % similaridade) a um isolado de referência do ATCC (*A. polyphaga* 30461), originário de um caso de ceratite (Texas, EUA).

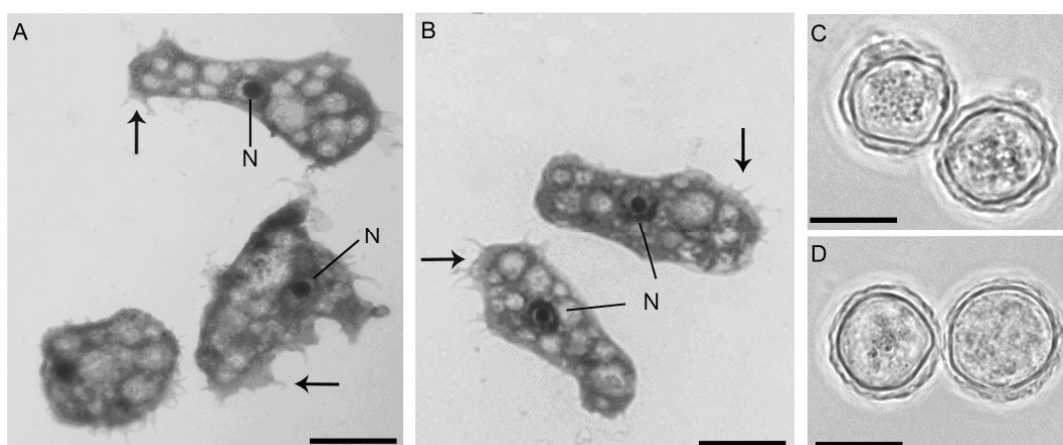


Figura 6. Microscopia óptica de *Acanthamoeba* ACC01 (A e C) e *A. polyphaga* ATCC 30461 (B e D). A - B: trofozoítas corados pelo panótico exibindo acantopódios (setas) e núcleo com nucléolo proeminente (N). C - D: cistos característicos do gênero *Acanthamoeba* exibindo a dupla parede cística. Escala = 10 μ m.

As análises filogenéticas baseadas no gene SSU rRNA foram realizadas a fim de inferir relações filogenéticas entre *Acanthamoeba* sp ACC01 e outros isolados de *Acanthamoeba*, incluindo quatro de casos de ceratites assinalados no Brasil. Em árvores geradas pelos métodos de neighbor-joining, máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML), os isolados brasileiros segregaram em dois sub-clados principais, verificando-se forte relacionamento genético entre o isolado ACC01 e *A. polyphaga* 30461 (similaridade de 99%). Os isolados clínicos brasileiros U/E10 e U/8R (similaridade: ~98,5%) foram mais filogeneticamente relacionados ao isolado ACC01 (similaridade de ~95,5% e 97%, respectivamente), enquanto que dois outros isolados

clínicos Brasileiros analisados neste estudo, U/E5 e U/E6 (95% e 95,5% de similaridade com ACC01), mostraram-se mais relacionados a *A. culbertsoni* Diamond.

Além da semelhança morfológica (Figura 6) e genética, também colocamos em evidência as semelhanças fisiológicas (termo- e osmotolerância) e bioquímicas (secreção de peptidases) entre *Acanthamoeba* ACC01 e *A. polyphaga* 30461. Termotolerância e osmotolerância, adaptações fisiológicas associadas diretamente a patogenicidade de *Acanthamoeba*, são frequentemente utilizadas como marcadores indiretos de virulência (DE JONCKHEERE, 1980; KHAN et al., 2001, 2002). As taxas de crescimento a diferentes temperaturas (28 e 37 °C) foram avaliadas para os dois isolados. Ambos exibiram taxas de crescimento semelhantes à temperatura de 28 °C (tempos de geração de 20 e 21,5 horas, respectivamente para *A. polyphaga* 30461 e o isolado ACC01) e ambos foram facilmente cultivados a 37 °C, observando-se, nesta temperatura, melhor crescimento do isolado brasileiro (tempo de geração de 21,1 horas, contra 29 horas determinado para *A. polyphaga* 30461).

O comportamento biológico dos dois isolados quando incubados em meio hiperosmolar foi também analisado. O aumento da osmolaridade do meio foi conseguido mediante adição de manitol (monossacarídeo que encontra aplicação clínica como diurético osmótico) ao agar não nutriente, que foi aqui utilizado às concentrações finais variando de 0,1 a 1,0 M. Os dois isolados apresentaram comportamento semelhante nas diferentes concentrações analisadas (Fig. 2A – Anexo 2): claramente suportaram concentrações elevadas de manitol, mas a multiplicação de trofozoítas foi progressiva- e negativamente afetada pelo aumento da concentração de manitol.

Acanthamoeba secreta uma grande variedade de proteases e alguns trabalhos correlacionam a secreção de serina peptidases com a patogenicidade das diferentes espécies (KHAN et al. 2000, 2006). O presente estudo avaliou a secreção de proteases nos dois isolados de *Acanthamoeba* (ACC01 e ATCC 30461), comparando, em meios condicionados a 28 e a 37 °C por trofozoítas, as taxas de hidrólise de azocaseína e o perfil de atividade visualizada em géis com gelatina copolimerizada. Níveis equivalentes de atividade azocaseinolítica foram observados para ambos os isolados em ampla faixa de pH (5,0 a 10,0), verificando-se, nos dois casos, taxas de hidrólise mais elevadas em pH neutro/alcalino; a forte inibição da reação por PMSF 5 mM, observada em meios condicionados pelos dois isolados examinados, indicou secreção importante de atividade associada serina peptidases.

Corroborando os resultados com azocaseína, o estudo de detecção em gel revelou a semelhança entre *Acanthamoeba* ACC01 e *A. polyphaga* 30461, indicada pelo idêntico perfil de bandas com atividade atribuída a serina peptidases, detectadas entre 33 e 150 kDa e melhor visualizadas em géis incubados em pH 8,0. O bloqueio de serina peptidases com PMSF 10 mM previamente à eletroforese, permitiu ainda mostrar, em géis incubados em pH 4,0, que os dois isolados aparentemente secretam as mesmas cisteína peptidases, entre as quais um duplê de 110-120 kDa e bandas com massa molecular aparente de 65, 45 e 37 kDa, todas fortemente inibidas por E-64 10 μ m, um inibidor específico e irreversível desta classe de peptidases.

REFERÊNCIAS¹

ADELEKE, A.; PRUCKLER, J.; BENSON, R.; ROWBOTHAM, T.; HALABLAB, M.; FIELDS, B. *Legionella*-like amoebal pathogens ± phylogenetic status and possible role in respiratory disease. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 2, p. 225-230, 1996.

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.

AITKEN, D.; HAY, J.; KINNEAR, F. B.; KIRKNESS, C. M.; LEE, W. R.; SEAL, D. V. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. **Ophthalmology**, v. 103, n. 3, p. 485-494, 1996.

AKSOZEK, A.; MCCLELLAN, K.; HOWARD, K.; NIEDERKORN, J.Y.; ALIZADEH, H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical; chemical; and radiological conditions. **J. Parasitol.**, v. 88, p. 621-623, 2002.

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

ALFIERI, S. C.; PRAL, E. M. F.; SHAW, E.; RAMAZEILLES, C.; RABINOVITCH, M. *Leishmania amazonensis*: Specific labeling of amastigote cysteine proteinases by radioiodinated *N*-benzyloxycarbonyl-tyrosyl-alanyl diazomethane. **Exp. Parasitol.**, v. 73, p. 424-432, 1991.

ALIZADEH, H.; LI, H.; NEELAM, S.; NIEDERKORN, J. Y. Modulation of corneal and stromal matrix metalloproteinase by mannose-induced *Acanthamoeba* cytolytic protein. **Ex. Eye Res.**, v. 87, p. 286-291, 2008.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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.**, v. 62, p. 1298-1303, 1994.

ALSAM, S.; SISSONS, J.; JAYASEKERA, S.; KHAN, N. A. Extracellular proteases of *Acanthamoeba castellanii* (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increased permeability in an *in vitro* model of the human blood-brain barrier. **J. Infect.**, v. 51, p. 150-156, 2005.

ALVES, J. M. P. Caracterização e filogenia moleculares de *Acanthamoeba*. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Parasitologia, São Paulo, 2001.

ALVES, J .M. P.; GUSMÃO, C. X.; TEIXEIRA, M. M. G.; FREITAS, D.; FORONDA, A. S.; AFFONSO, H.T. Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 19-26, 2000.

ANDERSON, I. J.; WATKINS, R. F.; SAMUELSON, J.; SPENCER, D. F.; MAJOROS, W. H.; GRAY, M. W.; LOFTUS, B. J. Gene discovery in the *Acanthamoeba castellanii* genome. **Protist**. v. 156, p. 203-14, 2005

BARETE, S.; COMBES, A.; DE JONCKHEERE, J. F.; DATRY, A.; VARNOUS, S.; MARTINEZ, V.; PTACEK, S. G.; CAUMES, E.; CAPRON, F.; FRANCÈS, C.; GIBERT, C.; CHOSIDOW, O. Fatal disseminated *Acanthamoeba lenticulata* infection in a heart transplant patient. **Emerg Infect Dis.**, v. 13, p. 736-768, 2007.

BEATTIE, T. K.; TOMLINSON, A.; MCFADYEN, A. K.; SEAL, D. V.; GRIMASON, A. M. Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: a new risk factor for infection? **Ophthalmology**, v. 110, p. 765–771, 2003.

BLASCHITZ, M.; KÖHSLER, M.; ASPÖCK, H.; WALOCHNIK, J. Detection of a serine proteinase gene in *Acanthamoeba* genotype T6 (Amoebozoa: Lobosea). **Exp. Parasitol.**, v. 114, p. 26-33, 2006.

BOGLER, S. A.; ZARLEY, C. D.; BURIANEK, L. L.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. Interstrain mitochondrial DNA polymorphism detected in *Acanthamoeba* by restriction endonuclease analysis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 8, n. 2, p. 145-163, 1983.

BOOTON, G. C.; KELLY, D. J.; CHU, Y. W.; SEAL, D. V.; HOUANG, E.; LAM, D. S.; BYERS, T. J.; FUERST, P. A. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba keratitis* patients in Hong Kong. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1621-1625, 2002.

BOTTONE, E.J. ; PEREZ, A. A.; GORDON, R. E.; QURESHI, M. N. Differential binding capacity and internalisation of bacterial substrates as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp. **J. Med. Microbiol.**, v. 40, p. 148-154, 1994.

BOWERS, B.; KORN, E. D. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. **J. Cell. Biol.**, v. 41, n 3, p. 786-805, 1969.

BOWERS, B.; KORN, E. D. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. **J. Cell. Biol.**, v. 39, p. 95–111, 1968.

BRINDLEY, N.; MATIN, A.; KHAN, N.A. *Acanthamoeba castellanii*: high antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. **Exp. Parasitol.**, v. 121, p. 254-256, 2009.

BROWN, M. R. W.; BARKER, J. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. **Trends. Microbiol.**, v. 7, p. 46–50, 1999.

BYERS, T. J.; HUGO, E. R.; STEWART, V. J. Genes of *Acanthamoeba*: DNA; RNA and protein sequences (a review). **J. Protozool.**, v. 37, p. 17S–25S, 1990.

CAO, Z.; JEFFERSON, D. M.; PANJWANI, N. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. **J. Biol. Chem.**, v. 25, p. 15838-15845, 1998.

CARVALHO, F. R. S.; CARRIJO-CARVALHO, L.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FORONDA, A. S.; DE FREITAS, D. Serine-like proteolytic enzymes correlated with differential pathogenicity in patients with acute *Acanthamoeba* keratitis. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, n. 4, p. 603-609, 2010.

CARVALHO, F. R.; FORONDA, A. S.; MANNIS, M. J.; HÖFLING-LIMA, A. L.; BELFORT, R. J R; DE FREITAS, D. Twenty years of *Acanthamoeba keratitis*. **Cornea.**, v. 28, n. 5, p. 516-519, 2009.

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

CAUMO, K.; FRASSON, A.P.; PENS, C.J.; PANATIERI, L.F.; FRAZZON, A.P.; ROTT, M.B. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **An. Trop. Med. Parasitol.**, v. 103, p. 477-85, 2009.

CHANG, P. C.; SOONG, H. K. *Acanthamoeba keratitis* in noncontact lens wearers. **Arch. Ophthalmol.**, v. 109, p. 463-464, 1991.

CHANG, J. C.; OSSOFF, S. F.; LOBE, D. C.; DORFMAN, M. H.; DUMAIS, C. M.; QUALLS, R. G.; JOHNSON, J. D. UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 49, n. 6, p. 1361-1365, 1985.

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

CIRILLO, J. D.; CIRILLO, S. L.; YAN, L.; BERMUDEZ, L. E.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L. S. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 9, p. 4427-4434, 1999.

CIRILLO, J. D.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L. S.; BERMUDEZ, L. E. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 3759-3767, 1997.

CIRILLO, J. D.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L. S. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 8, p. 3254-3261, 1994.

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

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

CULBERTSON, C. G. The pathogenicity of soil amoebas. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 25, p. 231-254, 1971.

CULBERTSON, C. G.; SMITH, J. W.; MINER, J. R. *Acanthamoeba* observation on animal pathogenicity. **Science**, v. 127, p.1506, 1958.

CURSONS, R. T.; BROWN, T. J.; KEYS, E. A.; MORIARTY, K. M.; TILL, D. Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. **Infect. Immun.**, v. 29, p. 401–407, 1980.

DE JONCKHEERE, J. F. Ecology of *Acanthamoeba*. **Ver. Infect. Dis.**, v. 13, p. 385-387, 1991.

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

DE JONCKHEERE, J. F.; VAN DE VOORDE, H. Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 31, n. 2, p. 294-297, 1976.

DE MORAES, J.; ALFIERI, S. C. Growth; encystment; and survival of *Acanthamoeba castellanii* grazing on different bacteria. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 66, p. 221-229, 2008.

DI CAVE, D.; MONNO, R.; BOTTALICO, P.; GUERRIERO, S.; D'AMELIO, S.; D'ORAZI, C.; BERRILLI, F. *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 28, p. 607-612, 2009.

DI CERA, E. Serine proteases. **IUBMB Life**. v.61, p. 510-515, 2009.

EKICI, O. D.; PAETZEL, M.; DALBEY, R. E. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. **Protein Sci.**, v. 17, p. 2023-2037, 2008.

FERRANTE, A. Immunity to *Acanthamoeba*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. S403–S409, 1991.

FERRANTE, A.; BATES, E. J. Elastase in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 3320-3321, 1988.

FERREIRA, G. A.; MAGLIANO, A. C.; PRAL, E. M.; ALFIERI, S. C. Elastase secretion in *Acanthamoeba polyphaga*. **Acta Trop.**, v. 112, p. 156-163, 2009.

FOWLER, M.; CARTER, R. F. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. **Br. Med. J.**, v. 25, p. 740-742, 1965.

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

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

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

GAST, R. J.; LEDEE, D. R.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 43, p. 498-504, 1996.

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

GIANINAZZI, C.; SCHILD, M.; WÜTHRICH, F.; MÜLLER, N.; SCHÜRCH, N.; GOTTSTEIN, B. Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. **Exp. Parasitol.**, v. 121, p. 180-186, 2009.

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

GUDMUNDSSON, O. G.; WOODWARD, D. F.; FOWLER, S. A.; ALLANSMITH, M. R. Identification of proteins in contact lens surface deposits by immunofluorescence microscopy. **Arch. Ophthalmol.**, v. 103, p. 196-197, 1985.

HADAS, E.; MAZUR, T. Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 44, p. 197-200, 1993.

HEASELGRAVE, W.; PATEL, N.; KILVINGTON, S.; KEHOE, S. C.; MCGUIGAN, K. G. Solar disinfection of poliovirus and *Acanthamoeba polyphaga* cysts in water—a laboratory study using simulated light. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 43, p. 125–130, 2006.

HE, Y.; NIEDERKORN, J. Y.; MCCULLEY, J. P.; STEWART, G. L.; MEYER, D. R.; SILVANY, R.; DOUGHERTY, J. *In vivo* and *in vitro* collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. **Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 31, p. 2235-2240, 1990.

HEDSTROM, L. An overview of serine proteases. **Curr. Protoc. Protein. Sci.**, Chapter 21, 2002.

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; (Lobosea: Acanthamoebidae). **Acta Protozool.**, v. 42, p. 325–329, 2003.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Q. Rev. Biol.**, v. 66, n. 4, p. 411-453, 1991.

HIRUKAWA, Y.; NAKATO, H.; IZUMI, S.; TSURUHARA, T.; TOMINO, S. Structure and expression of a cyst specific protein of *Acanthamoeba castellanii*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 29, n. 1398, p. 47-56, 1998.

HITI, K.; WALOCHNIK, C.; FASCHINGER, C.; HALLER-SCHÖBER, E. M.; ASPÖCK, H.; One- and two-step hydrogen peroxide contact lens disinfection solutions against *Acanthamoeba*: how effective are they? **Eye**, v. 19, p. 1301-1305, 2004.

HONG, Y.C.; KONG, H. H.; OCK, M. S.; KIM, I. S.; CHUNG, D. I. Isolation and characterization of a cDNA encoding a subtilisin-like serine proteinase (ahSUB) from *Acanthamoeba healyi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 111, p. 441-446, 2000.

HORN, M. T.; FRITSCHKE, R. K.; GAUTOM, K. H.; SCHLEIFER, A.; WAGNER, M. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. **Environ. Microbiol.**, v. 4, p. 357–367, 1999.

HURT, M.; NEELAM, S.; NIEDERKORN, J.; ALIZADEH, H. Pathogenic *Acanthamoeba* spp. secretes a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6243-6255, 2003.

HUWS, S. A.; MORLEY, R. J.; JONES, M. V.; BROWN, M. R.; SMITH, A. W. Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 282, n. 2, p. 258-265, 2008

IBRAHIM, Y. W.; BOASE, D. L.; CREE, I. A. Factors affecting the epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Ophthalm. Epidemiol.**, v. 14, p. 53-60, 2007.

KASHIWABUCHI, R.T.; FREITAS, D.; ALVARENGA, L.S.; VIEIRA, L.; CONTARINI, P.; SATO, E.; FORONDA, A.; HOFLING-LIMA, A.L. Corneal graft survival after therapeutic keratoplasty for *Acanthamoeba* keratitis. **Act. Ophthalmol.**, v. 86, p. 666-669, 2008.

KEELING, P. J.; BURGER, G.; DURNFORD, D. G.; LANG, B. F.; LEE, R. W.; PEARLMAN, R. E.; ROGER, A. J.; GRAY, M. W. The tree of eukaryotes. **Trends. Ecol. Evol.**, v. 20, p. 670-676, 2005.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 1051-1057, 2008.

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

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

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

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

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

KILVINGTON, S. Moist-heat disinfection of *Acanthamoeba* cysts. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. S418, 1991.

KILVINGTON, S.; PRICE, J. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 68, n. 5, p. 519-525, 1990.

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

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

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

KLIESCIKOVA, J.; KULDA, J.; NOHYNKOVA, E. Stress-induced pseudocyst formation: a newly identified mechanism of protection against organic solvents in acanthamoebae of the T4 genotype. **Protist**, v.162, p. 58-69, 2011b.

KLIESCIKOVA, J.; KULDA, J. Nohynkova Propylene glycol and contact lens solutions containing this diol induce pseudocyst formation in *Acanthamoebae*. **Exp. Parasitol.**, v. 127, p. 326–328, 2011a.

KLOTZ, S. I.; MISRA, R. P.; BUTRUS, S. I. Carbohydrate deposits on the surfaces of worn extended-wear soft contact lenses. **Arch. Ophthalmol.**, v. 105, p. 974–977, 1987.

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

LACKNER, P.; BEER, R.; BROESSNER, G.; HELBOK, R.; PFAUSLER, B.; BRENNEIS, C.; AUER, H.; WALOCHNIK, J.; SCHMUTZHARD, E. Acute granulomatous *acanthamoeba encephalitis* in an immunocompetent patient. **Neurocrit. Care.**, v. 12, p. 91-94, 2010.

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.**, v. 47, p. 1458-1462, 2009.

LEDEE, D. R.; HAY, J.; BYERS, T. J.; SEAL, D. V.; KIRKNESS, C. M. *Acanthamoeba griffini*. Molecular characterization of a new corneal pathogen. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 37, p. 544-550, 1996.

LEHMANN, O. J.; GREEN, S. M.; MORLET, N.; KILVINGTON, S.; KEYS, M. F.; MATHESON M. M.; DART, J. K.; MCGILL, J. I.; WATT, P. J. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba keratitis*. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 39, p. 1261–1265, 1998.

LEHER, H.; ZARAGOZA, F.; TAHERZADEH, S.; ALIZADEH, H.; NIEDERKORN, J. Y. Monoclonal IgA antibodies protect against *Acanthamoeba keratitis*. **Exp. Eye Res.**, v. 69, p. 75–84, 1999.

LEHER, H.; SILVANY, R.; ALIZADEH, H.; HUANG, J.; NIEDERKORN, J. Y. Mannose induces the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5-10, 1998.

LEWIS, E. J.; SAWYER, T. K. *Acanthamoeba tubiashi* n. sp., a new species of freshwater Amoebida (Acanthamoebida). **Trans. Am. Microsc. Soc.**, v. 98, p. 543-549, 1979.

LORENZO-MORALES, J.; KLIESCIKOVA, J.; MARTINEZ-CARRETERO, E.; DE PABLOS, L.M.; PROFOTOVA, B.; NOHYNKOVA, E.; OSUNA, A.; VALLADARES, B. Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp.: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. **Eukaryot. Cell.**, v. 7, n. 3, p. 509-517, 2008.

LORENZO-MORALES, J.; LÓPEZ-DARIAS, M.; MARTÍNEZ-CARRETERO, E.; VALLADARES, B. Isolation of potentially pathogenic strains of *Acanthamoeba* in wild squirrels from the Canary Islands and Morocco. **Exp. Parasitol.**, v. 117, p.74-79, 2007.

LORENZO-MORALES, J.; ORTEGA-RIVAS, A.; MARTÍNEZ, E.; KHOUBBANE, M.; ARTIGAS, P.; PERIAGO, M. V.; FORONDA, P.; ABREU-ACOSTA, N.; VALLADARES, B.; MAS-COMA, S. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. **Acta Trop.**, v. 100, p. 63-69, 2006.

MAGLIANO, A. C.; MAIA DA SILVA, F.; TEIXEIRA, M. M.; ALFIERI, S.C. Genotyping; physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba sp* isolated from tap water in Brazil. **Exp. Parasitol.**, v. 123, p. 231-235, 2009.

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.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 273-307, 2003.

MARCIANO-CABRAL, F.; PUFFENBARGER, R.; CABRAL, G.A. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 47, n. 1, p. 29-36, 2000.

MARTINEZ, A. J. **Free-living amebas**: natural history; prevention; diagnosis; pathology and treatment of disease. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 1-156.

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

MARTINEZ, A. J. Acanthamoebiasis and immunosuppression. Case report. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 41, n. 5, p. 548-557, 1982.

MAST, S. O.; DOYLE, W. L. Ingestion of fluids by *Amoeba*. **Protoplasma.**, v. 20, p. 555-560, 1934.

MATTANA, A.; CAPPAL, V.; ALBERTI, L.; SERRA, C.; FIORI, P.L.; CAPPUCCINELLI, P. ADP and other metabolites released from *Acanthamoeba castellanii* lead to human monocytic cell death through apoptosis and stimulate the secretion of proinflammatory cytokines. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4424-4432, 2002.

MAZUR, T.; HADAS, E.; IWANICKA, L. The duration of the cyst stage and viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 46, p. 106-108, 1995.

MITRA, M. M.; ALIZADEH, H.; GERAD, R. D.; NIEDERKORN, J. Y. Characterization of a plasminogen activator produced by *Acanthamoeba castellanii*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 73, p. 157-164, 1995.

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

MOON, E. K.; CHUNG, D. I.; HONG, Y. C.; KONG, H. H. Characterization of a serine proteinase mediating encystation of *Acanthamoeba*. **Eukaryot. Cell.**, v. 7, n. 9, p.1513-1517, 2008.

NA, B. K.; CHO, J. H.; SONG, C. Y.; KIM, T. S. Degradation of immunoglobulins, protease inhibitors and interleukin-1 by a secretory proteinase of *Acanthamoeba castellanii*. **Korean J. Parasitol.**, v. 40, p. 93-99, 2002.

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

NEFF, R. J.; NEFF, R. H. The biochemistry of amoebic encystment. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, v. 23, p. 51-81, 1969.

NEFF, R. J. Detection of synchrony induction in amoebae; problems in cell counting *In*: Synchrony in cell division and growth, **New York Inter Science Publishers**, p. 509-520, 1964.

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

NEFF, R. J. Purification, axenic cultivation and description of a soil amoeba, *Acanthamoeba* sp. **J. Protozool.**, v. 4, 176-182, 1957.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. J.; DEERFIELD, D. W. GeneDOC: Analysis and visualization of genetic variation. **EMBNEW News**. v.4, p. 14, 1997.

NAGINGTON, J.; WATSON, P. G.; PLAYFAIR, T. J.; MCGILL, J.; JONES, B. R.; STEELE, A. D. Amoebic infections of the eye. **Lancet**, v. 2, p. 1537-1540, 1974.

NIEDERKORN, J. Y.; ALIZADEH, H.; LEHER, H.; MCCULLEY, J. P. The pathogenesis of *Acanthamoeba keratitis*. **Microbes. Infect.**, v. 1, p. 437-443, 1999.

NUPRASERT, W.; PUTAPORNTIP, C.; PARIYAKANOK, L.; JONGWUTIWES, S. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and t10 genotype causing keratitis in Thailand. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 12, p. 4636-4640, 2010.

PAGE, F. C. **A new key to fresh water and soil gymnamoeba. (Culture Collection of Algae and Protozoa)**. Cumbria: England: Freshwater Biological Association, Ambleside, 1988.

PLOW, E. F.; HOOVER-PLOW, J. The functions of plasminogen in cardiovascular disease. **Trends. Cardiovasc. Med.**, v. 14, p. 180-186, 2004.

POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 62, p. 2161-2172, 2005.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, p. 817-818, 1998.

POTTER, J. L.; WEISMAN, R. A. Differentiation in *Acanthamoeba*: beta-glucan synthesis during encystment. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 20, n. 237, p. 65-74, 1971.

PRESTON, T. M.; RICHARD, H.; WOTTON, R. S. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. **FEMS Letters**, v. 194, p. 143-147, 2001.

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

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

RABINOVITCH, M.; DE STEFANO, M. J. Antibody and plant agglutinins stimulate phagocytosis of erythrocytes by *Acanthamoeba*. **Nature**, v. 17, n. 234, p. 414-415, 1971.

RAY, D. L.; HAYES, R. E. *Hartmannella astronyxis*: a new species of free-living amoeba. Cytology and life cycle. **J. Morphol.**, v. 95, p. 159-188, 1954.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 38, p. D227-33, 2010.

RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S. Ecology of free-living amoebae. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 20, p. 225-241, 1994.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**. 2003.

RUDENSKAYA, G. N.; PUPOV, D. V. Cysteine proteinases of microorganisms and viruses. **Biochemistry**. v. 73, p. 1-13, 2008.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, p. 1-21, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Rapid isolation of yeast DNA. In: Molecular cloning, a laboratory manual (Sambrook J and Russel DW, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2001.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. *In*. Proteolytic enzymes, a practical approach R.J. Beynon and J.S. Bond (eds.). Oxford University Press, Oxford, U.K., p. 25–55. 1989

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

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

SIDDIQUI, R.; EMES, R.; ELSHEIKHA, H.; KHAN, N. A. Area 51: How do *Acanthamoeba* invade the central nervous system? **Trends. Parasitol.**, v. 27, n. 5, p. 185-189, 2011.

SIEZEN, R. J.; RENCKENS, B.; BOEKHORST, J. Evolution of prokaryotic subtilases: genome-wide analysis reveals novel subfamilies with different catalytic residues. **Proteins.** v. 67, p. 681-694, 2007.

SILVA-VERGARA, M. L.; COLOMBO, E. R. C.; VISSOTTO, E. F.; SILVA, A. C. A. L.; CHICA, J. E. L.; ETCHEBEHERE, R. M.; ADAD, S. J. Disseminated *Balamuthia mandrillaris* amoeba infection in an AIDS patient from Brazil. **Am. J.Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p.1096-1098, 2007.

SMIRNOV, A. V.; BROWN, S. Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. **Protistology**, v. 3, p. 148–190, 2004.

SISON, J. P.; KEMPER, C. A.; LOVELESS, M.; MCSHANE, D.; VISVESVARA, G. S.; DERESINSKI, S. C. Disseminated *Acanthamoeba* infection in patients with AIDS: case reports and review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, n. 5, p. 1207-1216, 1995.

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.**, v. 6, p. 1-8, 2006.

SOGIN, M. L.; ELWOOD, H. J.; GUNDERSON, J. H. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 5, p. 1383-1387, 1986.

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

SPANAKOS, G.; TZANETOU, K.; MILTSAKAKIS, D.; PATSOULA, E.; MALAMOU-LADA, E.; VAKALIS, N. C. Genotyping of pathogenic *Acanthamoebae* isolated from clinical samples in Greece: report of a clinical isolate presenting T5 genotype. **Parasitol. Int.**, v. 55, p. 147-149, 2006.

SRIRAM, R.; SHOFF, M.; BOOTON, G.; FUERST, P.; VISVESVARA, G. S. Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46; p. 4045-4048, 2008.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**. v.22, p. 2688-2690, 2006.

STEINERT, M.; BIRKNESS, K.K.; WHITE, E.; FIELDS, B.; QUINN, F. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 2256–2261, 1998.

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. Eukaryot. Microbiol.**, v. 45, p. 45-54, 1998.

SWOFFORD, JR. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4b6. Sinauer Associates, Sunderland, 1998.

THOMAS, V.; MCDONNELL, G.; DENYER, S. P.; MAILLARD, J. Y. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 34, p. 231-259, 2010.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

TRIPATHI, R. C.; TRIPATHI, B. J. Lens spoilage. contact lenses: the contact lens assoc. ophth. In: DIABEZIES, O. (Ed.). **Guide to basic science and clinical practice**. Orlando, FL: Grune and Stratton, 1984. p. 45.1–45.33.

VISVESVARA, G. S. Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 23, n. 6, p. 590-594, 2010.

VISVESVARA, G. S.; BOOTON, G. C.; KELLEY, D. J.; FUERST, P.; SRIRAM, R.; FINKELSTEIN, A.; GARNER, M. M. In vitro culture; serologic and molecular analysis of *Acanthamoeba* isolated from the liver of a keel-billed toucan (*Ramphastos sulfuratus*). **Vet. Parasitol.**, v. 143, p. 74–78, 2007.

VISVESVARA, G. S.; MAGUIRE, J. H. Pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. **Trop. Infect. Dis.**, v. 2, p. 1114–1125, 2006.

VISVESVARA, G. S.; JONES, D. B.; ROBINSON, N. M. Isolation, identification, and biological characterization of *Acanthamoeba polyphaga* from a human eye. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 24, p. 784-790, 1975.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Correlations between morphological; molecular biological; and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 4408–4413, 2000

WANG, X.; AHEARN, D. G. Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*. **Curr. Microbiol.**, v. 34, n. 4, p. 212-215, 1997.

WEEKERS, P. H.; ENGELBERTS, A. M.; VOGELS, G. D. Bacteriolytic activities of the free-living soil amoebae; *Acanthamoeba castellanii*; *Acanthamoeba polyphaga* and *Hartmannella vermiformis*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 68, n. 3, p. 237-243, 1995.

WEEKERS, P. H.; BODELIER, P. L. E.; WIJEN, J. P. H.; VOGELS, G. D. Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*; *Acanthamoeba polyphaga*; and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 2317-2319, 1993.

WEISMAN, R.A. Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 30, p. 189-219, 1976.

WINIECKA-KRUSNELL, J.; LINDER, E. Bacterial infections of free-living amoebae. **Res. Microbiol.**, v.152, p. 613-619, 2001.

WINIECKA-KRUSNELL, J.; LINDER, E. Free-living amoebae protecting *Legionella* in water: the tip of an iceberg? **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 31, p. 383-385, 1999.

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

YAGITA, K.; MATIAS, R. R.; YASUDA, T.; NATIVIDAD, F. F.; ENRIQUEZ, G. L.; ENDO, T. *Acanthamoeba* sp. from the Philippines: electron microscopy studies on naturally occurring bacterial symbionts. **Parasitol. Res.**, v. 81, n. 2, p. 98-102, 1995.