

ANTICORPO MONOCLONAL MAB3: UMA FERRAMENTA PROMISSORA NO DIAGNÓSTICO DE ACANTAMEBÍASE E NO ESTUDO DE ENCISTAMENTO

Bianca Prado Costa¹, Michele Martha Weber Lima², Alessandra Becker Finco³,
Larissa Magalhães Alvarenga⁴

¹Universidade Federal do Paraná, Dep. de Patologia Básica (bianca.pradocosta@gmail.com)

²Universidade Federal do Paraná, Dep. de Patologia Básica (michelemlweber@gmail.com)

³Universidade Federal do Paraná, Dep. de Patologia Básica (abeckerfinco@gmail.com)

⁴Universidade Federal do Paraná, Dep. de Patologia Básica (lmalvarenga@gmail.com)

Resumo

Acanthamoeba são protozoários de vida livre, amplamente distribuídos na natureza, que podem ocasionalmente agir como parasitos, causando doenças como a ceratite amebiana e a encefalite amebiana granulomatosa, infecções cujo diagnóstico usual depende de técnicas demoradas e com baixa sensibilidade, além do tratamento ser dificultado pela formação de cistos resistentes. Neste contexto, anticorpos monoclonais apresentam-se como uma alternativa para tornar o diagnóstico destas patologias mais eficaz, além de serem uma ferramenta útil na busca de novos alvos terapêuticos. **Objetivos:** avaliar a capacidade do anticorpo monoclonal mAb3, de reconhecer trofozoítos de *Acanthamoeba* por citometria de fluxo (CF) e imunofluorescência (IF) diretas, e verificar o efeito do mAb3 sobre a cinética de encistamento de *Acanthamoeba*. **Métodos:** nos ensaios de CF e IF, o mAb3 foi conjugado ao fluoróforo FITC, o qual foi incubado com trofozoítos de *Acanthamoeba* de 7 diferentes cepas, utilizando como controles negativos trofozoítos não tratados com anticorpos e trofozoítos incubados com um anticorpo não específico conjugado à FITC. Para os ensaios de encistamento, os trofozoítos foram recuperados, lavados, colocados em meio Neff de encistamento, distribuídos em placa de 24 poços, nos quais foram adicionados o mAb3, anticorpos não-específicos ou apenas PBS. Os poços foram observados a cada 4 horas para contagem de trofozoítos, pré-cistos e cistos maduros. **Resultados:** O mAb3 foi capaz de detectar cepas com potencial patogênico por CF e IF diretas, mas não a cepa não patogênica. Além disso, observou-se uma alteração na cinética de encistamento na presença do mAb3, sendo que o anticorpo levou a um aumento na formação de pré-cistos nas primeiras horas de ensaio, sugerindo um possível efeito citotóxico. **Conclusões:** O mAb3 demonstra potencial aplicação no desenvolvimento de novos testes de imunodiagnóstico para acantamebíase, além de poder ser empregado no estudo de mecanismos de encistamento em *Acanthamoeba*, e na busca de novos tratamentos.

Palavras-chave: 1ª *Acanthamoeba*; 2ª Imunodiagnóstico; 3ª Encistamento.

Área Temática: Inovações e Tecnologias na Área Clínica e Cirúrgica;

Modalidade: Trabalho completo

Acanthamoeba é um gênero de protozoários de vida livre com distribuição ubíqua na natureza, estes organismos podem, entretanto, ocasionalmente agir como parasitos oportunistas e não oportunistas levando à patologias como a ceratite amebiana (CA) e a encefalite amebiana granulomatosa (EAG), respectivamente infecções de córnea e do sistema nervoso central (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

Existem grandes dificuldades quanto ao diagnóstico e tratamento destas doenças, pois os sinais clínicos são facilmente confundidos com aqueles causados por outros agentes etiológicos e, portanto, frequentemente resultam em um diagnóstico tardio. Além disso, o cultivo a partir de amostras de raspado corneal ou biópsia continua sendo o diagnóstico padrão, uma técnica demorada e com baixa sensibilidade. Destaca-se ademais a dificuldade que se tem no tratamento de acantamebíases, devido à capacidade dos trofozoítos de *Acanthamoeba* de transformarem-se em cistos resistentes às aos fármacos utilizados (LORENZO-MORALES et al., 2015; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2019).

Neste contexto, o emprego de anticorpos monoclonais mostra-se como uma alternativa no desenvolvimento de métodos diagnósticos mais rápidos e específicos para acantamebíases, além de nos auxiliarem na pesquisa e compreensão dos mecanismos em processos biológicos e patogênicos em *Acanthamoeba*, contribuindo na busca de novos alvos terapêuticos e terapias mais eficazes.

Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar a capacidade do mAb3, um anticorpo monoclonal anteriormente produzido por Becker-Finco et al. (2013), de reconhecer trofozoítos de *Acanthamoeba* por citometria de fluxo e imunofluorescência diretas, além de averiguar o efeito do mAb3 sobre a cinética de encistamento.

2 MÉTODO

A cepas incluídas neste trabalho encontram-se descritas na **Tabela 1**, e foram mantidas à 28°C em cultivo axênico em meio PYG (peptona, extrato de levedura, glucose). Dentre elas, foram utilizadas 3 cepas isoladas do raspado corneal de pacientes com ceratite, 3 cepas obtidas de poeira doméstica, e uma cepa não patogênica isolada do solo.

Para os ensaios de citometria de fluxo (CF) e imunofluorescência (IF), o mAb3 e um anticorpo não-específico (NSA) foram conjugados ao fluoróforo FITC para aplicação de uma metodologia de detecção direta. Os trofozoítos foram recuperados, lavados com PBS, fixados com paraformaldeído 2%, os sítios inespecíficos foram bloqueados com albumina 1%, e em seguida os trofozoítos foram incubados com 20 µg/ml dos anticorpos conjugados (mAb3-FITC e NSA-FITC). Para determinação da autofluorescência foram também incluídos trofozoítos não incubados com nenhum anticorpo (NA). Para CF e IF, respectivamente, a fluorescência das amostras foi medida pelo citômetro BD FACS Celesta (filtro B-530-30-A) e pelo Microscópio A1R MP Confocal Nikon e os resultados analisados pelos *softwares* Flowing e Fiji (WEBER-LIMA et al., 2020).

Tabela 1. Descrição das cepas de *Acanthamoeba*

Cepa	Origem/Axenização	Genótipo	Grupo Morfológico	Referência
AP2	Rasado Corneal, Houston, TX, EUA/1973	T4	II	ATCC 30461
ALX	Rasado Corneal, Vitória - ES, Brasil /2006	T4	II	Duarte et al. (2013)
LG	Rasado Corneal, Vitória - ES, Brasil/2011	T4	II	Duarte et al. (2013);
R2P5	Poeira Doméstica, Vitória - ES, Brasil/2011	T1	II	Possamai et al. (2018)
AR14	Poeira Doméstica, Vitória - ES, Brasil/2007	T4	II	Duarte et al. (2013)
AR15	Poeira Doméstica, Vitória - ES, Brasil/2007	T11	II	Duarte et al. (2013)
AC-G1	Solo, Vitória - ES, Brasil/2016	-	I	-

Fonte: Autores, 2021.

Para os ensaios de encistamento, foi estabelecido um protocolo de indução no qual os trofozoítos da cepa AP2 foram recuperados, lavados com salina de Page, ressuspensos em meio de encistamento de Neff, e distribuídos em placa de 24 poços (0,25 x 105 trofozoítos/poço).

Em seguida, os poços foram observados em microscópio de luz invertido, a cada 4 horas, sendo feita a análise de no mínimo 3 campos aleatórios ou 200 células e foram registradas as porcentagens de trofozoítos, pré-cistos e cistos maduros, conforme características descritas por Chávez-Munguía et al., 2013.

Após padronização do ensaio em condições normais, ele foi repetido adicionando aos poços no início do experimento 30 µg/ml de mAb3, anticorpos não específicos (NSA), ou apenas o veículo (PBS). Em seguida os poços foram observados nos tempos 4, 8, 12 e 24 horas e foi novamente documentada a porcentagem de *Acanthamoeba* nos diferentes estágios de encistamento. Ademais, foi calculada a taxa de formação de pré-cistos através da fórmula %trofozoítos em t_1 - %trofozoítos em t_2 (WEBER-LIMA et al., 2020).

Todas análises estatísticas foram realizadas através do *software* GraphPad Prism 8.0.1, aplicando o teste de ANOVA de duas vias. Valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras das cepas com potencial patogênico AP2, ALX, LG, R2P5, AR14 e AR15 tratadas com mAb3-FITC mostraram fluorescência superior à dos controles negativos tratadas com anticorpos não específicos (NSA-FITC) ou sem adição de anticorpos (NA), como evidenciado pelo deslocamento dos picos nos histogramas (**Figura 1A**), e pela diferença estatisticamente significativa entre a média de fluorescência dos eventos dos grupos tratados com o mAb3-FITC quando comparados aos controles negativos (**Figura 1B**).

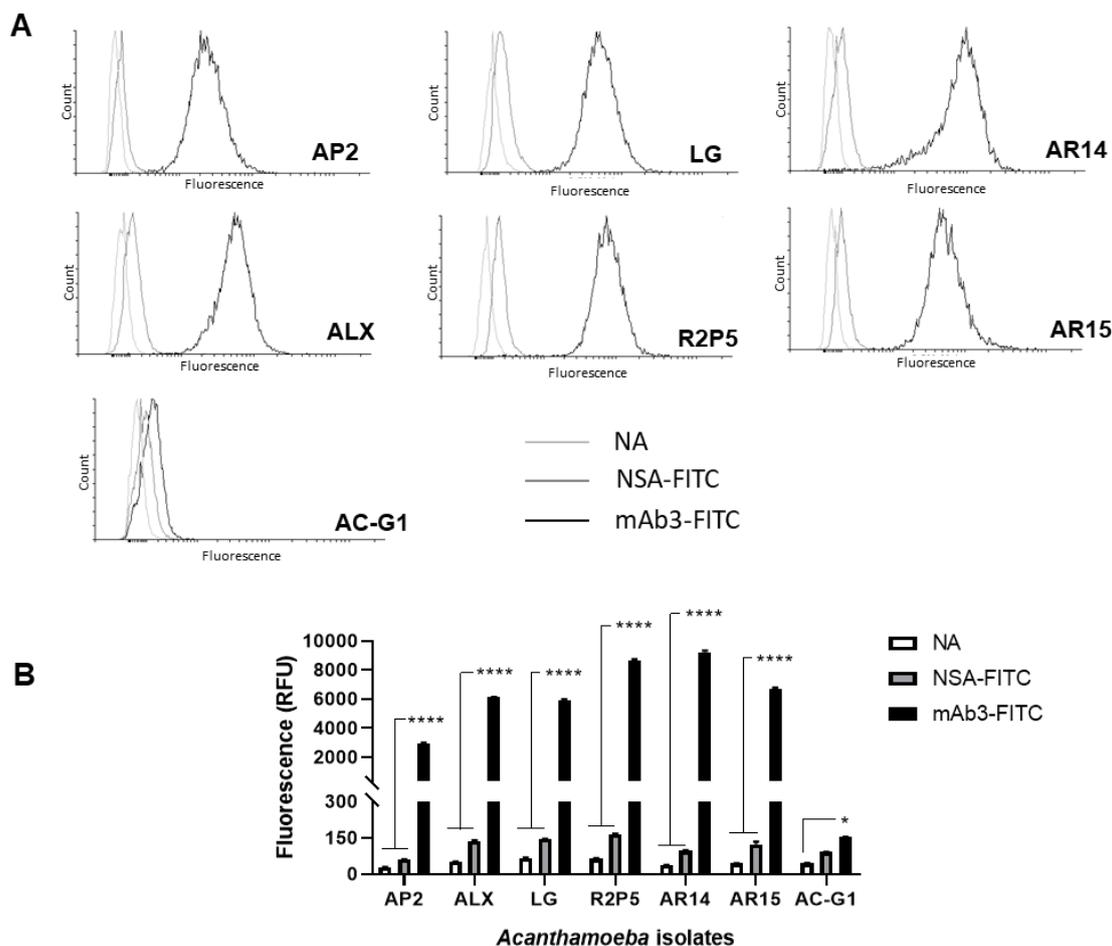
O mAb3 foi, entretanto, incapaz de reconhecer o isolado AC-G1 não patogênico - apesar de ser possível observar pequeno deslocamento do pico referente à amostra tratada com mAb3 quando comparada à amostra não tratada com anticorpo (**Figura 1**), ainda houve grande sobreposição da fluorescência entre os três grupos.

É importante notar, entretanto, que o número de trofozoítos utilizados para realização do ensaio (3×10^4) é superior ao que se estima ser possível recuperar em uma amostra de raspado corneal de um paciente com CA. Logo, são necessários ensaios futuros para determinar a sensibilidade do método.

Apesar disso, outros casos na literatura de aplicação de anticorpos na detecção de trofozoítos de *Acanthamoeba* por citometria de fluxo (KHAN et al., 2000; TURNER et al., 2005), foram bem sucedidas, entretanto utilizando amostras com um número de trofozoítos

ainda superior (1×10^6 e 1×10^7), com uma diferença de fluorescência entre os controles negativos e amostras positivas menor do que a obtida neste trabalho, e, além disso, com a aplicação de um protocolo de citometria indireto, o qual apresenta a desvantagem de ser mais laborioso e com maior risco de reatividade inespecífica do que o protocolo aqui proposto.

Figura 1. Reatividade do mAb3 frente às cepas de *Acanthamoeba* por citometria de fluxo direta



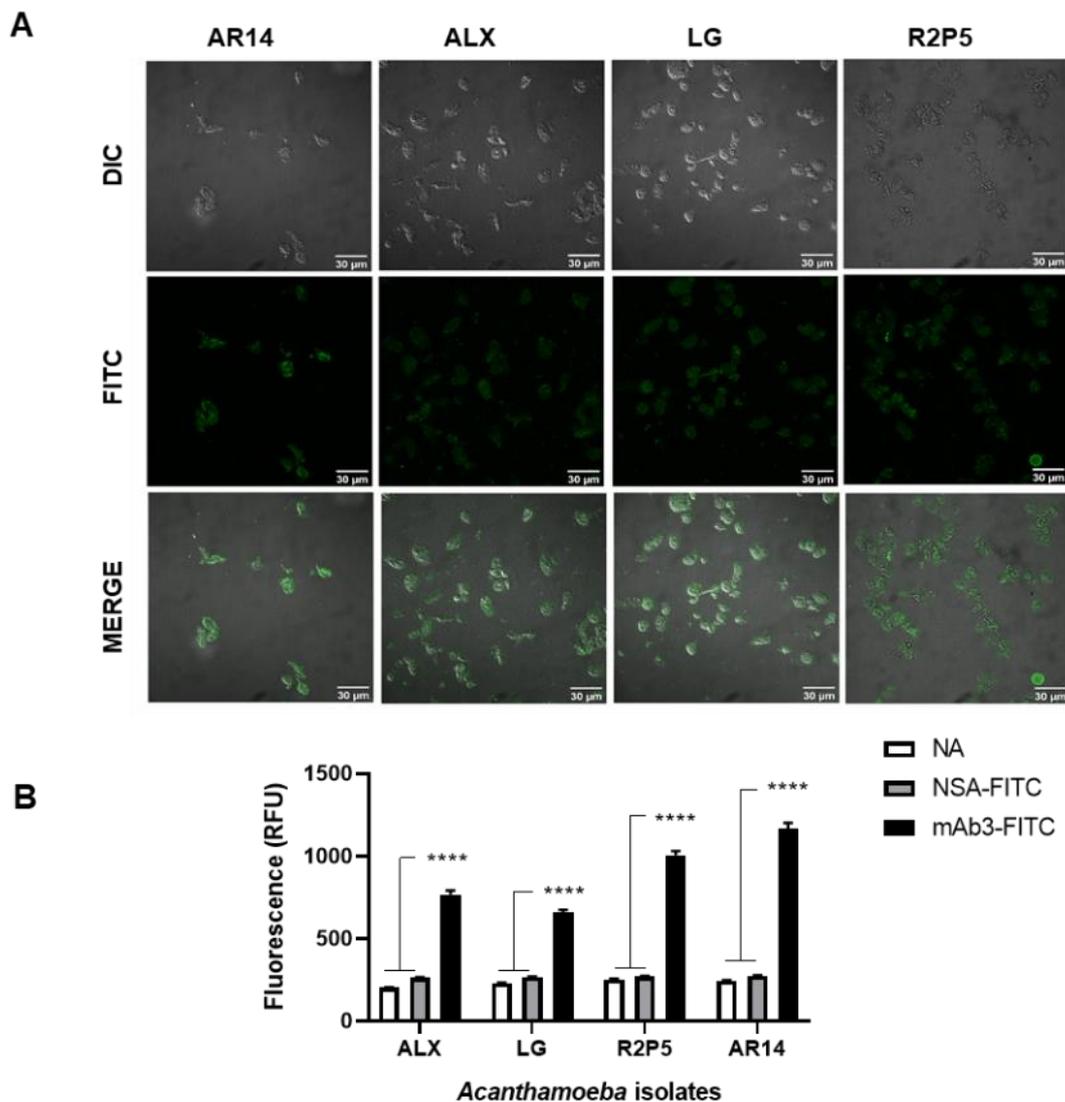
(A) Histogramas *overlay* e (B) quantificação de unidades relativas de fluorescência (RFU) dos trofozoítos tratados com mAb3-FITC, NSA-FITC, ou sem anticorpos (NA). Dados apresentados correspondem à média \pm erro padrão, $5453 < n < 10785$, **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$. Fonte: Autores, 2021.

Os resultados obtidos nos experimentos de imunofluorescência (IF) corroboram com o que foi observado na citometria de fluxo, com os trofozoítos de amostras tratadas com mAb3-FITC apresentando uma média de fluorescência significativamente superior à dos controles negativos (**Figura 2**).

Apesar de alguns laboratórios já empregarem esta técnica no auxílio do diagnóstico da CA (LORENZO-MORALES et al. 2015), e de existirem diversos trabalhos que utilizam a IF

para detecção de trofozoítos (KHAN et al., 2000; MAGNET et al., 2012; BECKER-FINCO et al., 2013; KANG et al., 2018), muitos deles fazem o uso de anticorpos policlonais (cuja produção exige imunização e sangria constante de animais) e todos aplicam uma metodologia indireta de detecção, cujas desvantagens já foram previamente mencionadas.

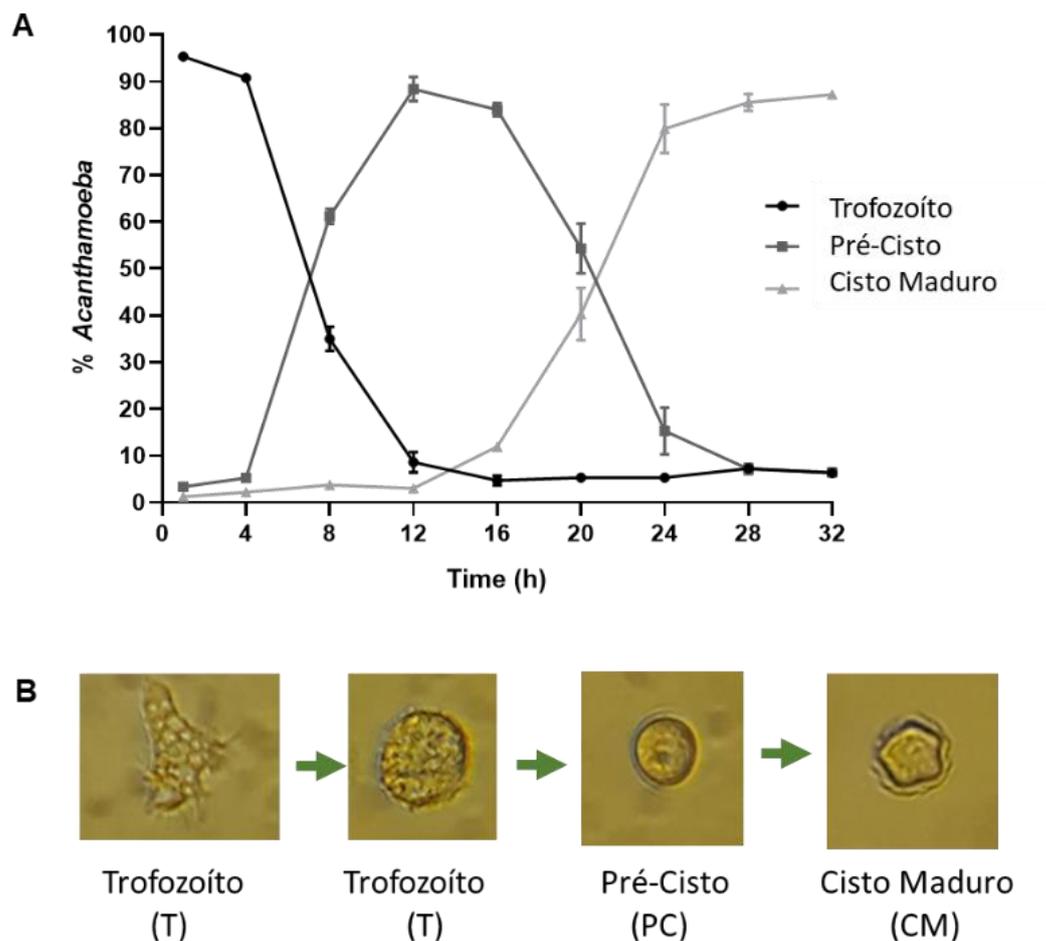
Figura 2. Reatividade do mAb3 frente a cepas de *Acanthamoeba* por imunofluorescência direta.



(A) Imagens de imunofluorescência de trofozoítos tratados com mAb3-FITC geradas usando contraste de interferência diferencial (DIC) e captação de fluorescência (FITC). A autofluorescência dos trofozoítos foi subtraída da intensidade de fluorescência observada nas imagens. (B) Quantificação da fluorescência (RFU) dos trofozoítos tratados com mAb3-FITC, NSA-FITC, ou sem anticorpos (NA). Dados apresentados correspondem à média \pm erro padrão, $n = 100$, **** $p < 0,0001$. Fonte: Autores, 2021.

Ademais, nota-se que a marcação observada nas imagens de IF ocorre na ausência de uma etapa de permeabilização, indicando que o alvo do anticorpo seja um componente presente na membrana plasmática dos trofozoítos.

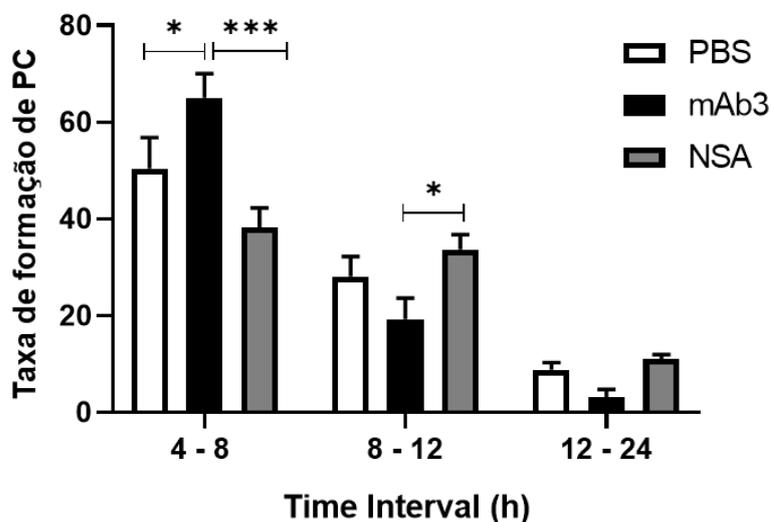
Figura 3. Curva de encistamento da cepa AP2 em condições padrão



(A) Resultados correspondem à junção de experimentos independentes para construção da curva no período 32 horas. Pontos no gráfico correspondem à média \pm desvio padrão, n=4 (tempos 1, 12 e 24 horas), n=2 (tempos 4, 8, 16, 20, 28 e 32 horas). (B) Progressão dos estágios de encistamento, observados por microscopia de luz. Fonte: Autores, 2021.

Quanto aos ensaios de encistamento, como é possível observar na **Figura 3A**, a cinética de encistamento da cepa AP2 mostra, inicialmente uma porcentagem alta de trofozoítos, a qual decresce gradativamente na mesma proporção em que tem-se um aumento na formação de pré-cistos, que atinge um pico aproximadamente em $t = 12$ horas, e começa a diminuir conforme há o aumento na porcentagem de cistos maduros, a qual chega à um valor máximo por volta das 24 horas e parece manter um *plateau* nas horas seguintes. Na **Figura 3B**, está apresentada a progressão dos estágios de encistamento.

Figura 4. Efeito do mAb3 sobre a cinética de encistamento de *Acanthamoeba*



Taxa de formação de pré-cistos (PC) na presença de mAb3 (30 $\mu\text{g/mL}$), NSA (30 $\mu\text{g/mL}$) e veículo (PBS). Barras representam média \pm erro padrão (n=4), *p<0.05, ***p<0.001. Fonte: Autores, 2021.

Após padronização das condições do ensaio, foi adicionado o mAb3 ao meio Neff para avaliação do seu efeito sobre a cinética de encistamento. Observou-se, nas primeiras horas do ensaio um aumento na taxa de formação de pré-cistos estatisticamente significativa na presença do mAb3 quando comparada ao grupo tratado apenas com PBS e uma diferença ainda mais expressiva quando comparado ao grupo tratado com anticorpos inespecíficos (**Figura 4**). Indicando que o mAb3 tenha causado um aumento na velocidade do encistamento. Embora o período de transição entre pré-cistos e cistos maduros não tenha sido investigado, pode-se sugerir que estes resultados sejam devido à um possível efeito citotóxico do mAb3 sobre os trofozoítos induzindo à um encistamento mais rápido. São necessários, porém, mais experimentos especificamente para avaliar a citotoxicidade do mAb3, e investigar mais profundamente este efeito.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível confirmar que o anticorpo monoclonal mAb3 é capaz de reconhecer trofozoítos patogênicos de *Acanthamoeba* por imunofluorescência e citometria de

fluxo através de um método de detecção direto, demonstrando seu potencial para o desenvolvimento de imunoenaios para o diagnóstico de acantamebíases.

Ademais, foi observada uma alteração na cinética de encistamento da cepa AP2 na presença do mAb3, possivelmente causada por ação citotóxica. Mais ensaios devem ser realizados para investigar esta hipótese, entretanto, acredita-se que estes sejam dados promissores a respeito da possibilidade de aplicação do anticorpo em combinação com outros fármacos como tratamento de patologias causadas por *Acanthamoeba*, além de ser uma ferramenta importante no estudo de sua proteína alvo e seu papel no processo de encistamento desses organismos.

REFERÊNCIAS

BECKER-FINCO, A.; COSTA, A. O.; SILVA, S. K.; *et al.* Physiological, morphological, and immunochemical parameters used for the characterization of clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*. **Parasitology**, v. 140, n. 3, p. 396–405, 2013.

CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; SALAZAR-VILLATORO, L.; LAGUNES-GUILLÉN, A.; *et al.* *Acanthamoeba castellanii* cysts: new ultrastructural findings. **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1125–1130, 2013.

DUARTE, J. L.; FURST, C.; KLISIOWICZ, D. R.; *et al.* Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 9–14, 2013.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, D.; REYES-BATLLE M.; CASTELAN-RAMIREZ I.; *et al.* Evaluation of the sensitivity to chlorhexidine, voriconazole and itraconazole of T4 genotype *Acanthamoeba* isolated from Mexico. **Experimental Parasitology**, v. 197, p. 29–35, 2019.

KANG, A.Y.; PARK, A.Y.; SHIN, H.J.; *et al.* Production of a monoclonal antibody against a mannose-binding protein of *Acanthamoeba culbertsoni* and its localization. **Experimental Parasitology**, v. 192, p. 19–24, 2018.

KHAN, N. A.; GREENMAN, J.; TOPPING, K. P.; *et al.* Isolation of *Acanthamoeba*-Specific Antibodies from a Bacteriophage Display Library. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2374–2377, 2000.

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

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

MAGNET, A.; GALVÁN, A. L.; FENOY, S.; *et al.* Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 383–392, 2012.

POSSAMAI, C. O.; LOSS, A. C.; COSTA, A. O.; *et al.* *Acanthamoeba* of three morphological groups and distinct genotypes exhibit variable and weakly inter-related physiological properties. **Parasitology Research**, v. 117, n. 5, p. 1389–1400, 2018.

TURNER, M. L.; COCKERELL, E. J.; BRERETON, H. M.; *et al.* Antigens of selected *Acanthamoeba* species detected with monoclonal antibodies. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 9, p. 981–990, 2005.

WEBER-LIMA, M. M.; PRADO-COSTA, B.; BECKER-FINCO, A.; *et al.* *Acanthamoeba* spp. monoclonal antibody against a CPA2 transporter: a promising molecular tool for acanthamoebiasis diagnosis and encystment study. **Parasitology**, v. 147, n. 14, p. 1678–1688, 2020.